

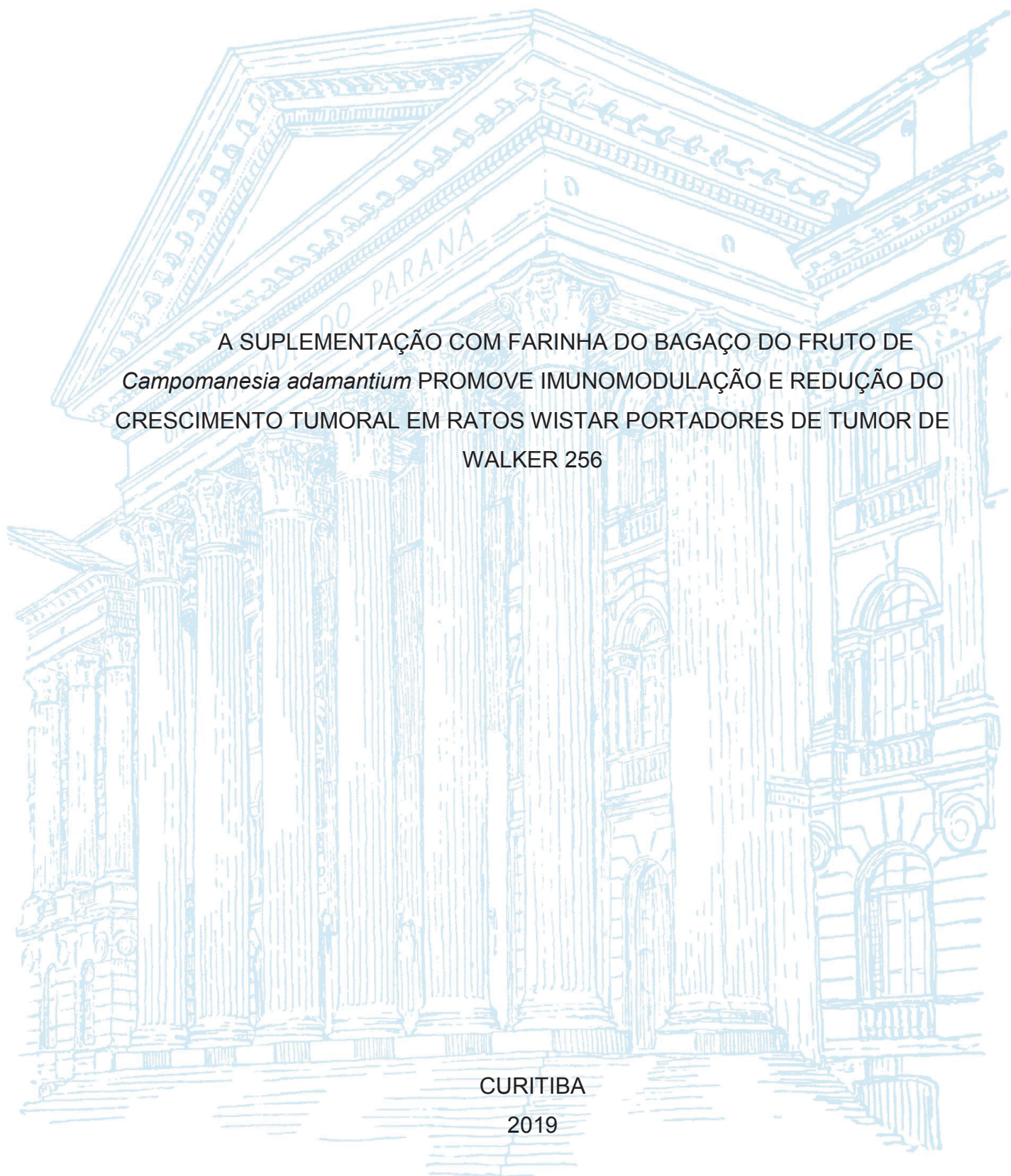
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATÁLIA EIRÃO ZULIN

A SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DO BAGAÇO DO FRUTO DE
Campomanesia adamantium PROMOVE IMUNOMODULAÇÃO E REDUÇÃO DO
CRESCIMENTO TUMORAL EM RATOS WISTAR PORTADORES DE TUMOR DE
WALKER 256

CURITIBA

2019



NATÁLIA EIRÃO ZULIN

A SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DO BAGAÇO DO FRUTO
DE *Campomanesia adamantium* PROMOVE IMUNOMODULAÇÃO E
REDUÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL EM RATOS WISTAR
PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre
em Ciências Fisiológicas, pelo
Departamento de Ciências Fisiológicas,
Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Fabíola Iagher

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Zulin, Natália Eirão

A suplementação com farinha do bagaço do fruto de *Campomanesia adamantium* promove imunomodulação e redução do crescimento tumoral em ratos Wistar portadores de tumor de Walker 246. / Natália Eirão Zulin.
– Curitiba, 2019.

69 p.: il.

Orientadora: Fabíola Iagher

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Guabiju 2. Imunomodulação 3. Ratos 4. Carcinoma 256 de Walker
I. Título II. Iagher, Fabíola, 1975- III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (22. ed.) 571.96

ATA Nº31

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FISIOLÓGIA

No dia vinte e seis de novembro de dois mil e dezenove às 13:30 horas, na sala 471, Anfiteatro 03 do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **NATALIA EIRAO ZULIN** intitulada: **A SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DO BAGAÇO DO FRUTO DE *campomanesia adamantium* PROMOVE IMUNOMODULAÇÃO E REDUÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL EM RATOS WISTAR PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256.**, sob orientação da Profa. Dra. **FABÍOLA IAGHER**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná em FISIOLÓGIA, foi constituída pelos seguintes Membros: **FABÍOLA IAGHER** (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), **RICARDO FERNANDEZ PEREZ** (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ) **MARCELO KRYCZYK** (CENTRO UNIVERSITÁRIO DOM BOSCO- UNIDOMBOSCO-PR). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, **FABÍOLA IAGHER**, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 26 de Novembro de 2019.



FABÍOLA IAGHER

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



RICARDO FERNANDEZ PEREZ

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MARCELO KRYCZYK

Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO DOM BOSCO- UNIDOMBOSCO-PR)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISIOLÓGIA -
40001016072P4

TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FISIOLÓGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATALIA EIRAO ZULIN** intitulada: **A SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DO BAGAÇO DO FRUTO DE *campomanesia adamantium* PROMOVE IMUNOMODULAÇÃO E REDUÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL EM RATOS WISTAR PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256.**, sob orientação da Profa. Dra. **FABÍOLA IAGHER**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Novembro de 2019.


FABÍOLA IAGHER

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


RICARDO FERNANDEZ PEREZ

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


MARCELO KRYCZYK

Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO DOM BOSCO- UNIDOMBOSCO-PR)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1153

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.005769/2018-83

APROVADO/APPROVAL: 20/03/2018 – R.O. 02/2018

TÍTULO: Efeito da suplementação com resíduo de casca do fruto de *Campomanesia adamantium* sobre crescimento tumoral e parâmetros imunitários de ratos Wistar portadores de tumor de Walker 256.

TITLE: Effect of *Campomanesia adamantium* fruit peel residue supplementation on tumor growth and immune system of Walker 256 tumor bearing rats.

AUTORES/AUTHORS: Fabíola Iagher, Natália Eirão Zulin, Carolina Garcia Martins, Débora Salles da Silva Coutinho, Bruna Comoti Oliveira, Marcia Helena Appel.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA

Este trabalho é dedicado àqueles que são essenciais e que mais amo: meus pais Dorival e Antônia, meus irmãos Alexandre e Rodrigo, meu esposo Diogo e ao meu pedacinho de gente mais doce, meu filho Alexandre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado força de continuar com esse trabalho diante de tantas turbulências dos últimos anos, por sempre me emitir luz e mostrar que sou capaz.

Aos meus pais, Dorival e Antônio que sempre me ofereceram apoio em qualquer jornada que resolver percorrer e incentivaram a estudar e a buscar independência.

Aos meus irmãos Alexandre e Rodrigo, por sempre serem exemplos, de seres humanos éticos, comprometidos e por me envolverem no mundo da leitura.

À minha avó, Aparecida, pelo seu enorme coração, sabedoria e exemplo de mulher líder, determinada e empoderada.

Ao meu companheiro, Diogo, pela paciência, apoio, paciência, incentivo e paciência.

A minha orientadora Fabíola Iagher por essa intensa experiência, sabedoria, apoio e por me contagiar com seu brilho nos olhos pela profissão e pela vida e, principalmente por confiar e não desistir de mim durante esse caminho.

A Carolina Martins, pessoa incrível, por toda sua paciência, dedicação, conhecimento, luz, força e parceria para que este trabalho fosse possível.

A todos os membros do Laboratório de Metabolismo Celular, Carolina, Débora, Sthefany, Bruna, Daiana, Amanda, Matheus, Malu e professora Márcia, por compartilharem seus conhecimentos, por colaborarem ao meu crescimento pessoal e profissional e pela intensa ajuda em cada experimento. Muito obrigada.

A todos os professores do departamento de fisiologia pelos conhecimentos compartilhados.

Durante nossa caminhada profissional, há pessoas que passam por nossas vidas e nos tocam, aqui quero agradecer àquelas que direta ou indiretamente colaboraram com essa escolha e conquista por serem exemplo, incentivo e admiração: Ana Leite Bailone, Neuza Maria Martini, Andréia Bendine Gastaldi, Marisa Pires Moraes e Rafael Alves. Sem saberem, vocês são luz e inspiração às pessoas em seus caminhos.

RESUMO

Campomanesia adamantium é uma planta nativa do Brasil e seus frutos são conhecidos como guavira, os quais são processados industrialmente para extração de polpa, gerando grande quantidade de bagaço como resíduo industrial. O bagaço é constituído de casca, restos de polpa e sementes da fruta, e após secagem e pulverização gera a farinha de bagaço de guavira (FBG). Esta farinha é rica em substâncias antioxidantes e fibras alimentares (polissacarídeos), compostos que, segundo a literatura, usualmente apresentam efeito imunomodulatório e antitumoral. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ingestão de FBG sobre crescimento tumoral e parâmetros imunitários de ratos portadores ou não de tumor de Walker 256. Ratos Wistar foram separados em 4 grupos experimentais: C, controle (sem tumor e sem suplementação com FBG); CT, controle tratado (sem tumor, com suplementação); W, walker (com tumor, sem suplementação); WT, walker tratado (com tumor e com suplementação). Os animais suplementados receberam 63 mg/200g de peso corpóreo da FBG diariamente, em dois modelos: Modelo de 15 dias, em que a suplementação ocorreu simultaneamente ao crescimento tumoral durante 15 dias; Modelo de 45 dias, em que a suplementação aconteceu durante 30 dias antes da inoculação tumoral, e continuou por 15 dias durante o desenvolvimento do tumor. Após eutanásia foram avaliados parâmetros tumorais e imunitários. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$. A ingestão da FBG por 15 dias não interferiu no crescimento tumoral, mas promoveu imunomodulação. Macrófagos de animais dos grupos tratados apresentaram aumento da adesão (7%, C vs CT; 15%, W vs WT), aumento da capacidade fagocítica (10%, W vs WT), e aumento da produção de óxido nítrico (66%, C vs CT; 85%, W vs WT). Linfócitos do timo do grupo W apresentaram acentuada redução da capacidade proliferativa em relação ao grupo C, e linfócitos do grupo WT foram capazes de manter a capacidade proliferativa semelhante à dos animais sem tumor. Mesmo padrão de resposta foi obtido para linfócitos de linfonodos mesentéricos. A ingestão da FBG durante 45 dias promoveu 70% de redução da massa tumoral, bem como redução da capacidade proliferativa *ex vivo* (~ 40%). Macrófagos de animais dos grupos tratados apresentaram aumento da adesão (14%, C vs CT; 10%, W vs WT), mas redução da capacidade fagocítica (8%, W vs WT), redução da retenção lisossomal (15%, W vs WT) e redução da produção de óxido nítrico (40%, W vs WT). Animais sem tumor suplementados com FBG (grupo CT) apresentaram leve aumento da capacidade fagocítica macrofágica em relação ao grupo C (~7%, $p < 0,05$), e grande aumento da produção de NO (~100%, $p < 0,0001$). Linfócitos T e B do sangue do grupo WT apresentaram resposta semelhante a de animais sem tumor, enquanto que os de órgãos linfóides apresentaram resposta similar à do grupo W. Linfócitos B do sangue, T do timo, e B e T de linfonodos apresentaram redução da proliferação no grupo CT em relação a C (10 – 20%, $p < 0,05$). Os resultados sugerem que o resíduo industrial de guavira na forma de farinha pode ser utilizado como suplemento alimentar com efeito antitumoral e imunomodulador.

Palavras-chave: guavira; macrófagos; linfócitos; tumor de Walker 256.

ABSTRACT

Campomanesia adamantium is a native plant from Brazil. Its fruits are known as guavira, which are processed industrially for pulp extraction, generating a large amount of pomace as industrial waste. The pomace is made up of peel, pulp, and fruit seeds, and after drying and spraying, it generates guavira pomace flour (GPF). GPF contains antioxidants and dietary fibers (polysaccharides), which usually have immunomodulatory and antitumor effects. The objective of this study was to evaluate the impact of GPF ingestion on tumor growth and immune parameters of Walker 256 tumor and non-tumor bearing rats. Male Wistar rats were separated into four experimental groups: C, control (no tumor and no FBG supplementation); CT, treated control (no tumor, with supplementation); W, walker (with tumor, without supplementation); WT, treated walker (with tumor and with supplementation). Supplemented animals received 63 mg/200g body weight of GPF daily, for 15 days. Two supplementation schemes were adopted: a) supplementation was made for 15 days, simultaneously to tumor growth; b) supplementation was initiated 30 days before tumor cells inoculation, and was maintained during tumor growth for 15 days, totalizing 45 days of supplementation. After euthanasia, tumor and immune parameters were evaluated. The data were submitted to a two-way analysis of variance followed by Tukey post-test, with a significance level of $p < 0.05$. Ingestion of GPF for 15 days did not interfere with tumor growth but promoted immunomodulation. Macrophages from animals of treated groups showed increased adhesion (7%, C vs. CT; 15%, W vs. WT), increased phagocytic capacity (10%, W vs. WT); and increased nitric oxide production (66%, C vs. CT; 85%, W vs. WT). Thymus lymphocytes from W animals showed a marked reduction in proliferative capacity compared to group C. However, supplementation with GPF (WT group) was able to maintain lymphocyte proliferation similar to that of non-tumor bearing rats. The same response pattern was obtained for mesenteric lymph node lymphocytes. Ingestion of GPF for 45 days promoted a reduction of 70% in tumor mass, and reduction of proliferative capacity (~40%). Macrophages from CT and WT animals showed increased adhesion (14%, C vs. CT; 10%, W vs. WT), but reduced phagocytic capacity (8%, W vs. WT), reduced lysosomal retention (15%, W vs. WT) and reduction of nitric oxide production (40%, W vs. WT). Tumor-free animals supplemented with GPF (CT group) showed a slight increase in macrophage phagocytic capacity compared to group C (~7%, $p < 0.05$) and significant increase in NO production (~100%, $p < 0.0001$). Circulating T and B lymphocytes of WT group showed a similar response to animals without tumor. Lymphocytes from lymphoid organs of WT group showed identical response to that from the W group. Lymphocytes from supplemented non-tumor bearing rats (CT) decreased proliferation in comparison to C (10 - 20%, $p < 0.05$). The results suggest that GPF can be used as a food supplement with antitumor and immunomodulatory effect.

Keywords: guavira; macrophages; lymphocytes, Walker 256 tumor.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1: | Evolução do peso corpóreo dos animais (experimento de 15 dias). | 36 |
| Figura 2: | Evolução do peso corpóreo dos animais (experimento de 45 dias). | 37 |
| Figura 3: | Massa tumoral in vivo (A) e proliferação de células de tumor de Walker 256 ex vivo após 24, 48 e 72 h (B) de ratos submetidos ao experimento de 15 dias..... | 38 |
| Figura 4: | Massa tumoral in vivo (A) e proliferação de células de tumor de Walker 256 ex vivo após 24, 48 e 72 h (B) de ratos submetidos ao experimento de 45 dias..... | 39 |
| Figura 5: | Capacidade de adesão (A), capacidade fagocítica (B), retenção lisossomal (C) e produção de óxido nítrico (D) de macrófagos de ratos submetidos ao experimento de 15 dias | 40 |
| Figura 6: | Capacidade de adesão (A), capacidade fagocítica (B), retenção lisossomal (C) e produção de óxido nítrico (D) de macrófagos de ratos submetidos ao experimento de 45 dias. | 42 |
| Figura 7: | Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos do sangue de ratos submetidos ao modelo de 15 dias..... | 43 |
| Figura 8: | Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos do timo de ratos submetidos ao modelo de 15 dias. | 44 |
| Figura 9: | Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos de linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao modelo de 15 dias. | 45 |
| Figura 10: | Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos de sangue de ratos submetidos a modelo de 45 dias..... | 46 |
| Figura 11: | Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos de timo de ratos submetidos a modelo de 45 dias. | 47 |
| Figura 12: | Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos de linfonodos mesentéricos de ratos submetidos a modelo de 45 dias. | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos..... | 49 |
|--|----|

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| APC | Célula apresentadora de antígenos |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| CAT | Catalase |
| CD4 | Cluster de diferenciação 4 |
| CD8 | Cluster de diferenciação 8 |
| ConA | Concanavalina A |
| COX | Enzima ciclo-oxigenase |
| DAMPs | Padrões moleculares associados a danos |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ERN | Espécie reativa de nitrogênio |
| ERO | Espécie reativa de oxigênio |
| FBG | Farinha do bagaço de guavira |
| Gal-3 | Galectina 3 |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| GST | Glutathione S-transferase |
| H2O2 | Peroxido de hidrogênio |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| INF- γ | Interferon gama |
| MHC I | Complexo de histocompatibilidade principal tipo I |
| MHC II | Complexo de histocompatibilidade principal tipo II |
| NF κ B | Fator de transcrição kappa B |
| NK | Linfócitos <i>natural killer</i> |
| NO | Oxido nítrico |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PAMPs | Padrões moleculares associados a patógenos |
| PBS | Solução tampão fosfato |
| PRR | Receptores reconhecimento de padrão |
| SOD | Superóxido dismutase |

| | |
|---------------|--|
| TAMs | Células tumorais associadas a macrófagos |
| TCR | Receptor de célula T |
| Th1 | Linfócitos T helper tipo 1 |
| Th2 | Linfócitos T helper tipo 2 |
| TLR | Receptor Toll-like |
| TNF- α | Fator alfa de necrose tumoral |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 | CÂNCER | 11 |
| 1.2 | SISTEMA IMUNITÁRIO | 15 |
| 1.3 | Campomanesia <i>adamantium</i> | 20 |
| 2 | OBJETIVOS | 28 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 28 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 28 |
| 3 | METODOLOGIA | 29 |
| 3.1 | ANIMAIS | 29 |
| 3.2 | DESENHO EXPERIMENTAL | 29 |
| 3.3 | OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE TUMOR DE WALKER PARA INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA | 30 |
| 3.4 | MASSA TUMORAL | 31 |
| 3.5 | CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE CÉLULAS TUMORAIS | 31 |
| 3.6 | FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS | 31 |
| 3.6.1 | ISOLAMENTO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS | 32 |
| 3.6.2 | AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS | 32 |
| 3.7 | CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS | 33 |
| 3.7.1 | ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS DO SANGUE, TIMO E LINFONODOS MESENTÉRICOS | 33 |
| 3.7.2 | CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS | 34 |
| 3.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 35 |
| 4 | RESULTADOS | 36 |
| 4.1 | PARÂMETROS TUMORAIS | 36 |
| 4.2 | PARÂMETROS IMUNITÁRIOS | 39 |
| 4.2.1 | ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS | 39 |
| 4.2.2 | PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS | 42 |
| 5 | DISCUSSÃO | 50 |
| 6 | CONCLUSÃO | 59 |
| | REFERÊNCIAS | 60 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer é definido como um conjunto de mais de 100 doenças que, em comum, apresentam crescimento celular desordenado, com capacidade de invasão de tecidos e órgãos (INCA, 2019a). Assim, a dificuldade em alcançar o controle e a cura se dá pelo fato de que câncer não pode ser considerado uma única patologia, mas uma combinação de desordens e desregulações no crescimento celular, causadas por mutações no DNA, adquiridas espontaneamente ou induzidas por agressões do ambiente (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Em nível mundial, em 2012 houve 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de óbitos. A maior incidência encontra-se nos países desenvolvidos, entretanto, nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos há maior mortalidade (INCA, 2017a). As transformações demográficas, sociais e econômicas que vêm ocorrendo nas últimas décadas, juntamente com uma transição epidemiológica, impactaram no aumento da incidência de cânceres associados ao melhor nível socioeconômico (mama, próstata e cólon), ao mesmo tempo em que se elevou a incidência de tumores associados a condições sociais menos favorecidas (colo do útero, estômago, cabeça e pescoço) (INCA, 2017b). No Brasil, para o biênio 2018-2019, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 420 mil casos de câncer, excetuando-se o de pele não melanoma.

Atualmente o câncer constitui a segunda principal causa de morte no mundo, com um a cada seis óbitos relacionados à doença. Destes, um terço das mortes podem ser associadas a riscos comportamentais e alimentares, como o alto índice de massa corporal, baixo consumo de frutas e vegetais, falta de atividade física, e uso de álcool e tabaco (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2018).

O início e a progressão da carcinogênese ocorrem devido à exposição a fatores internos e externos, sendo que os fatores externos, como a

exposição a agentes físicos, químicos, biológicos, alimentação e hábitos de vida não saudáveis, entre outros, são responsáveis por 80 a 90% dos cânceres. Os fatores internos, como hereditariedade, correspondem aos 10 a 20% (INCA, 2019b). Mutações, envelhecimento, inflamação e exposição crônica a agentes cancerígenos predispõem ao câncer por promover heterogeneidade epigenética em populações celulares vulneráveis, resultando em alterações na expressão de genes, como os oncogenes, que quando ativados trazem vantagens adaptativas às células possibilitando as neoplasias. Também podemos ter alterações nos genes supressores tumorais, que com as mutações perdem as suas funções supressoras, facilitando a oncogênese (FEINBERG; KOLDOBSKIY; GÖNDÖR, 2016).

A identidade de cada tipo celular é vinculada aos fatores de transcrição, que determinam o tipo celular a ser expresso. Uma ativação anormal da atividade de seus fatores de transcrição favorece o desenvolvimento e a progressão da carcinogênese através da ativação de oncogenes ou inibição dos genes supressores, ocasionando células pouco diferenciadas e com elevada taxa de divisão (KRON; BAILEY; LUPIEN, 2014). Para manter a sua alta taxa proliferativa, as células neoplásicas exibem metabolismo diferenciado, com predominância de captação energética via glicólise, mesmo na presença de oxigênio, caracterizando o efeito Warburg (BOROUGHES; DEBERARDINIS, 2016). Fisiologicamente células em repouso utilizam a via oxidativa para manter sua homeostase pela produção máxima de ATP e, para a divisão celular, elas dependem de estimulação por fatores de crescimento. Sendo que apenas durante a proliferação celular há aumento da glicólise aeróbica, mesmo diante da maior eficiência energética da fosforilação oxidativa. Essa preferência pela glicólise é devida ao fato de ser rota inicial para várias vias metabólicas, pois células em proliferação, além de energia, necessitam satisfazer suas demandas anabólicas para a síntese das macromoléculas (nucleotídeos, lipídios e proteínas) e de antioxidantes (CANTOR; SABATINI, 2012; KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011).

Desta forma, no estroma tumoral há predomínio da glicólise aeróbica devido a necessidade de suprir precursores abundantes para vias anabólicas, com intermediários para diversas vias subsidiárias à produção de

macromoléculas e assim suportar seu crescimento celular desordenado (BOROUGHES; DEBERARDINIS, 2016).

Essa reprogramação metabólica é resultado da ativação de oncogenes e inibição dos genes supressores, ocasionando perda de fatores das vias de transdução de sinais, como a regulação do ciclo celular e sinalização proliferativa (WARD; THOMPSON, 2013). Essas mudanças no metabolismo, fazem com que o tecido tumoral necessite de maior captação de nutrientes para suprir a bioenergética alterada, a biossíntese aprimorada e o balanço redox, característicos das massas tumorais (BOROUGHES; DEBERARDINIS, 2016). Consequentemente as células mutadas não respondem adequadamente aos fatores de crescimento do meio e mantem divisão celular incontrolável, com maior captação de glicose e predomínio do efeito de Warburg, aumentando os níveis de ácido láctico no meio (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011).

A acidez ocasionada por esse acúmulo de ácido láctico, também pode ser reforçada por outros fatores, comuns na maioria dos tumores, como má vascularização, alterações de oxigênio, temperatura, pH e nutrientes, que colaboram para a manutenção do meio ácido, influenciando na invasão tumoral e evasão imune (CANTOR; SABATINI, 2012).

Colaborando com as alterações bioquímicas observadas nos pacientes oncológicos, além do crescimento celular desordenado, um estado inflamatório, originado pelas secreções de citocinas, principalmente interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelo tumor e sistema imune colaboram para o desperdício energético observado no câncer. Essas alterações bioquímicas, como o aumento da quebra de macromoléculas de carboidratos, lipídeos e proteínas, resultam em hipoglicemia, hipercolesterolemia e perda de massa muscular (ROHM et al., 2019).

Em síntese, temos características comuns entre as células neoplásicas, que consistem em intensa sinalização proliferativa, inibição de supressores de crescimento, resistência à morte celular, indução de angiogênese, invasão e metástase, reprogramação do metabolismo e fuga do sistema imunitário. Porém a complexidade genética e a epigenética do câncer trazem obstáculos no tratamento oncológico, já que não existem duas células

iguais e o microambiente tumoral colabora com respostas celulares individuais, prejudicando a erradicação total da doença (HOEFER et al., 2019).

Após o diagnóstico da doença, o tratamento estabelecido irá depender do tipo do tumor, localização, estadiamento e objetivo terapêutico, que pode visar a cura, prolongar tempo de vida ou manter uma qualidade de vida o mais confortável possível. Atualmente há três tipos de tratamentos oncológicos convencionais, a quimioterapia, radioterapia e cirurgia, que habitualmente são utilizados em conjunto dependendo da suscetibilidade do tumor. A quimioterapia ainda é a modalidade de tratamento predominante, de ação sistêmica, agindo em células em proliferação celular, pois interfere no ciclo de divisão, trazendo efeitos colaterais diversos, devido à perda das células saudáveis, pois quanto maior a capacidade proliferativa de um dado tipo celular, maiores as complicações relacionadas ao tecido correspondente. Devido a essas características as principais complicações incluem: alopecia, náuseas, vômitos, diarreia, mucosites, entre outros. Essas complicações justificam o esquema de administração em ciclos, pois o organismo necessita de tempo para recuperação das células saudáveis (INCA, 2019b).

São compreensíveis as dificuldades existentes no combate ao câncer uma vez que as células neoplásicas interferem na homeostase do hospedeiro, com alterações metabólicas sistêmicas, interferências nas ações do sistema imune, além de possuírem capacidades de adaptações facilitando a resistência aos recursos terapêuticos disponíveis e relutância na eliminação definitiva das células mutadas (CHABNER et al., 2015). Tais dificuldades estimulam as buscas por alternativas menos agressivas, menos tóxicas e mais naturais para a prevenção, tratamento ou alívio das complicações neoplásicas.

Os produtos naturais possuem diversas propriedades com ações biológicas importantes para o organismo, que despertam interesses na investigação de seus efeitos e posterior desenvolvimento de agentes medicamentosos (ALVES et al., 2019).

Em um estudo conduzido na Itália e Suíça incluindo mais de 10.000 casos de 14 cânceres diferentes e cerca de 17.000 controles, investigaram-se os hábitos alimentares dos participantes nos últimos dois anos antes do

diagnóstico, utilizando questionário validado. Encontrou-se uma relação de proteção contra o câncer com o consumo de vegetais e frutas, pois esses alimentos possuem grande variedade de compostos bioativos com atividades antioxidantes, modulação de enzimas de desintoxicação, propriedades anti-mutagênicas e antiproliferativas e estimulação do sistema imunológico (TURATI et al., 2015). Desta forma a alimentação tem um importante papel na manutenção da higidez do organismo devido à presença de diversos elementos que conferem proteção à saúde e/ou auxílio na luta contra doenças.

1.2 SISTEMA IMUNITÁRIO

O sistema imunitário é uma complexa rede de elementos sincronizados, responsáveis por manter o ambiente interno protegido contra invasores e substâncias que possam interferir na homeostase do organismo, como toxinas, células tumorais, metabólitos, entre outros. A proteção de contra patógenos ocorre primariamente por diversas barreiras fisiológicas, físicas e químicas, e, caso essas falhem, há um repertório de células de defesa do sistema inato associado com a proteção mais específica da imunidade adaptativa (ELKON; RHIANNON, 2012).

A primeira linha de defesa é composta pelas barreiras físicas e químicas, existentes em toda mucosa que possui contato com o meio externo como o epitélio do trato gastrointestinal, pulmonar e urogenital. Cada um desses sistemas possui seu componente particular de defesa, como os cílios e muco do sistema respiratório, o pH ácido do suco gástrico, entre outros. Além dessas barreiras, abaixo da camada epitelial, na lâmina própria há células dendríticas e macrófagos, que atuam como mais uma barreira, monitorando cuidadosamente o ambiente, identificando e impedindo a entrada de partículas estranhas (YATIM; LAKKIS, 2015).

Durante a formação das células de defesa na medula óssea, há a diferenciação de duas linhagens celulares, as células mieloides e linfoides. As células da linhagem mioide fazem parte do sistema imune inato, que didaticamente é conhecido como a primeira linha de defesa celular contra

patógenos, devido sua velocidade de ação e inespecificidade. Seus componentes incluem células fagocíticas, apresentadoras de antígenos (APC) e matadoras naturais (NK), além de substâncias como o sistema complemento, citocinas, proteína C reativa, dentre outras (COTA; MIDWINTER, 2015). As células de linhagem mieloide possuem em suas membranas receptores *toll-like* (TLR), que são receptores de reconhecimento de padrões (PRR), capazes de identificar partículas específicas, denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), quando trata-se de microrganismos e também temos os padrões moleculares associados a danos (DAMPs), referente a compostos que sinalizam sofrimento celular. Uma vez ativados os PRR, há como reação a fagocitose, aumento e maturação celular de APC. Esse conjunto de ações sincronizadas é essencial para barrar o invasor enquanto ocorre a ativação do sistema imune adaptativo (HATO; DAGHER, 2015).

A defesa inata oferece ação imediata na defesa do organismo, pois seu sistema de reconhecimento é capaz de identificar localização microbiana, viabilidade, replicação e patogenicidade. Os PAMPs reconhecidos são diversos, os principais são lipopolissacarídeos (LPS), glicolipídios, lipoproteínas, nucleotídeos e ácidos nucleicos. A ativação dos PRR induz a secreção de citocinas, recrutando fagócitos da circulação (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015). As principais citocinas liberadas na fase inicial do ataque inato são o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6), as quais são pró-inflamatórias, e estimulam o recrutamento de mais células ao local de combate e auxílio do sistema complemento (MARSHALL et al., 2018).

Em todas as nossas células nucleadas, temos proteínas de membrana que fazem parte do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I, já as células de defesa APC também expressam MHC denominado de classe II. O MHC é proteína chave para a ação de vistoria do sistema imunitário, pois as células de defesa reconhecem o que é “próprio” do organismo através do MHC celular (CRUVINEL et al., 2010).

Células com invasão de microrganismos intracelulares introduzem parte do antígeno ao seu MHC-I, deixando-o exposto na membrana, sinalizando que está infectada, desta forma ela é identificada pelo sistema imune e é eliminada. Já patógenos extracelulares são fagocitados e, seus

antígenos são incorporados ao MHC-II, sendo apresentados aos linfócitos. O sensor que interage com o complexo antígeno-MHC é chamado de receptor de células T (TCR). Aqui se inicia a estimulação da resposta imune adaptativa (COTA; MIDWINTER, 2015).

A resposta adaptativa é composta pelas células de linhagem linfoide, os linfócitos T e B. Células T patrulham todo o organismo interagindo seus receptores TCR com o MHC das células. Quando identificam algum antígeno ou é apresentado pelas APC, o linfócito é estimulado a diferenciar-se e realizar uma expansão clonal, gerando muitas células com proteínas CD que as capacitam a agir. Temos as células T-CD8 que são citotóxicas, que atacam células infectadas diretamente e T-CD4, também conhecidas como auxiliares, que liberam sinais para atrair macrófagos e neutrófilos ao local e também ativam as células B, e que são responsáveis pela produção de anticorpos (MARSHALL et al., 2018).

Os anticorpos produzidos pelos linfócitos B passam por um processo de seleção e maturação, proporcionando uma defesa precoce e direcionada no caso de um segundo contato com o mesmo patógeno (HATO; DAGHER, 2015).

Alguns patógenos intracelulares e células tumorais são capazes de evitar ou diminuir a expressão das moléculas de MHC na superfície das células, mas possuímos as células NK que em suas patrulhas eliminam quaisquer células que tenham ausência ou redução de MHC (ELKON; RHIANNON, 2012).

O fenótipo celular é direcionado pelo ambiente em que a célula está inserida e as citocinas são substâncias que permitem orientação, ação e comunicação entre as células, sendo liberadas pelas próprias células de defesa, pelo ambiente ou pelos tecidos em sofrimento. A composição do fluido que banha o ambiente possui influência na maturação celular, os macrófagos, por exemplo, podem ser polarizados em tipos M1 e M2. Macrófagos M1 são pró-inflamatórios, agem na defesa contra patógenos, secretam espécies reativas de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS) e citocinas, tais como IL-12, IL-6 ou IL-1. Também inibem células imunossupressoras e amplificam a ação de células T auxiliares do tipo Th1. Mas, sob um microambiente estimulado por IL-4, IL-10 ou glicocorticoides, os

macrófagos imaturos se polarizam em M2, os quais são anti-inflamatórios, reduzem a secreção de citocinas inflamatórias e favorecem a angiogênese para remodelação tecidual. Essas ações ambíguas são necessárias para garantir inicialmente a eliminação da ameaça detectada e, posteriormente propiciar a reconstrução e homeostase do local onde ocorreu o conflito imune (DOMBLIDES; LARTIGUE; FAUSTIN, 2018).

Tão importante quanto o combate a invasores, precisamos da nossa defesa contra “o próprio”, quando este possui danos ou alterações celulares, sendo uma arma importante na eliminação de células com potenciais neoplásicos. A vigilância imunitária é capacitada para eliminar células detectadas com mutações ou em sofrimento com maestria, mas há a possibilidade de escape imunológico, condição em que as células imunes não identificam ou não conseguem eliminar as células alteradas e estas podem se desenvolver, levando à expansão, invasão e metástase, caracterizando a fase da oncogênese definida como fuga imune (MESSERSCHMIDT; PRENDERGAST; MESSERSCHMIDT, 2016).

Como o câncer compreende várias doenças, tem-se perdido o foco apenas nas alterações celulares, mas aumentando a atenção ao hospedeiro e ao microambiente tumoral. A íntima interação entre o câncer e o sistema imunitário determina se as células neoplásicas serão eliminadas, entrarão em equilíbrio ou alcançarão fuga imunológica. O escape imune caracteriza-se por aumento de células imunossupressoras, tais como Treg e células supressoras derivadas de mieloides (MDSC), com aumento de citocinas supressoras e células T pouco funcionais (FINN, 2012).

No escape imune as células mutadas ficam irreconhecíveis, se desenvolvem e induzem mecanismos imunossupressores, como secreção de citocinas específicas e diferenciação de células imunomoduladoras, como IL-10, células T reguladoras (Treg) e macrófagos M2. Assim, em alguns contextos, respostas imunes específicas ditam o destino do paciente com câncer, uma vez que a eliminação de células oncológicas se dá de forma mais efetiva em hospedeiros imunocompetentes (ZITVOGEL et al., 2013).

A inflamação tecidual colabora com o escape imunológico, pois as células inatas influenciam alterações celulares, que favorecem tanto a iniciação quanto a progressão tumoral. A inflamação crônica é caracterizada

pela ação de macrófagos M2 e células dendríticas, as quais criam um ambiente mutagênico, com a liberação de mediadores inflamatórios, como IL-6, interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ROS e RNS, que ativam a STAT-3 e NF-KB, induzindo instabilidade gênica. Os tumores malignos são frequentemente infiltrados de células imunes inatas e de células tumorais associadas a macrófagos (TAMs), sendo o principal componente da infiltração leucocitária dentro de um tumor, com muitas características em comum com macrófagos M2, estimulando o desenvolvimento, progressão e disseminação de células tumorais (HAGERLING; CASBON; WERB, 2015).

O predomínio de um ambiente em inflamação crônica favorece a proliferação do estroma tumoral composto pelas células mutadas protegidas por fibroblastos, células endoteliais, nervosas, imunes e a matriz extracelular. A infiltração de células imunes possui influência direta no prognóstico do câncer, com efeitos positivos ou negativos, dependendo da estimulação pró ou anti-inflamatória, sendo os macrófagos e neutrófilos as principais células envolvidas (CORTHAY, 2014). Macrófagos anti-inflamatórios (M2), estimulam a angiogênese pela produção de IL-10, inibem células T, CD e NK pela privação de arginina e facilitam a invasão tumoral devido ao remodelamento do estroma por metaloproteases da matriz. A IL-10 também aumenta a ativação de células Treg, principalmente CD4, causando inibição da imunidade antitumoral, indução de parada do ciclo celular e apoptose (JANSSEN et al., 2017).

A íntima relação entre o câncer e o sistema imunitário está a cada dia sendo mais bem elucidada. E, também há nessa relação a colaboração do estado nutricional, pois sabe-se que os componentes da dieta são capazes de realizar modulação celular, com vários nutrientes bioativos que são capazes de aumentar a resposta imune inata, a citotoxicidade de NK e TCD8, além de aumentar citocinas anti-inflamatórias, diminuir células Treg e melhorar a imunidade antitumoral (RUTERING et al., 2015).

Como descrito acima, o sistema imunitário conta com complexa interação de células especializadas e seus produtos, os quais são influenciados por diversos fatores incluindo a dieta. Fibras alimentares, mais especificamente polissacarídeos oriundos de frutas vem sendo alvo de investigação por seu potencial imunomoduladoras (PISTACIA et al., [s.d.];

WANG et al., 2018) e também antitumoral (DA SILVA et al., 2014; DELPHI; SEPEHRI; KHORRAMIZADEH, 2015; DELPHI; SEPEHRI; PHYSIOLOGY, 2016; IZQUIERDO-VEGA et al., 2017; LAGO et al., 2014; LI et al., 2015; ZHANG et al., 2019). O resíduo industrial (bagaço) do fruto de *Campomanesia adamantium* foi escolhido como alvo de investigação neste trabalho.

1.3 *Campomanesia adamantium*

O cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, com uma área em torno de 2 milhões de km². Corresponde a parte mais central do país, abrangendo os estados de Goiás, Tocantins, Maranhão, Piauí, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Distrito Federal. É considerada uma rica savana tropical, com cerca de 5% de toda a diversidade do planeta, abrigando 30% de todos os seres vivos identificados no Brasil (RIBEIRO; WALTER, 1998). As frutas provenientes do cerrado são ricas em nutrientes, fibras, micronutrientes e vitaminas, além de compostos com vastas atividades biológicas, sendo importante fonte de nutracêuticos promissores.

Entre essa rica flora da região está a *Campomanesia adamantium*, árvore que pertence à família das Mirtáceas, nativa do Brasil, predominante na região Centro-Oeste e no Sudeste. Seus frutos são conhecidos como guavira, gabirola, guabirola-do-campo, guabirola-do-cerrado, guabirola-lisa e guabirola-branca (ARANTES; MONTEIRO, 2002). Suculentos e ácidos os frutos são utilizados na indústria alimentícia devido a suas qualidades, tais como elevado teor de ácido ascórbico, minerais, compostos fenólicos e fibra alimentar, e sendo potente fonte de antioxidantes o seu consumo contribui para a proteção do organismo contra danos dos radicais livres (MEDEIROS ALVES et al., 2013). A planta também é conhecida popularmente devido a suas propriedades medicinais pelos efeitos antidiarreicos, antimicrobianos, antitumorais, antirreumáticos e agentes anti-inflamatórios (PASCOAL et al., 2014).

Diferentes espécies do gênero *Campomanesia* já foram avaliadas quanto a seus potenciais biológicos, com diversos efeitos positivos à saúde,

sendo considerados dignos de nota os efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antiproliferativos, hipolipidêmicos, entre outros (CARDOSO et al., 2018).

A *C. adamantium* é abundante em compostos fenólicos e flavonoides, tanto nas cascas das frutas (LESCANO et al., 2016, 2018), assim como nas polpas (PASCOAL et al., 2014), sementes (VISCARDI et al., 2017a), folhas (COUTINHO et al., 2008; FERREIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2016) e raízes (CAMPOS et al., 2017).

As folhas ostentam alto potencial antioxidante, importantes na estabilização da oxidação lipídica, ocasionando proteção às células (COUTINHO et al., 2008). As folhas e raízes foram eficazes ao induzir a morte de células leucêmicas *in vitro* via apoptose tardia, com ativação das caspases 9 e 3, com maior eficácia com o extrato das folhas com maior concentração do composto fenólico cardomonina, evidenciando potencial ação terapêutica na prevenção e tratamento de doenças tumorais (CAMPOS et al., 2017). As frutas, que também são ricas em cardomonina, foram capazes de inibir células de câncer de próstata humano *in vitro*, com efeitos antiproliferativos e indução apoptótica, sendo potencial agente citotóxico ao tratamento e prevenção do câncer (PASCOAL et al., 2014). Concentrado aquoso das folhas apresentou propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, pela redução de enzimas responsáveis pela produção de prostaglandinas e óxido nítrico, que são importantes mediadores inflamatórios. Também houve a redução de moléculas pró-inflamatórias com o TNF α e aumento de IL-10, citocina anti-inflamatória, sendo as ações atribuídas aos flavonóis presentes no extrato (FERREIRA et al., 2013). As raízes também apresentaram alta capacidade antioxidante auxiliando na redução dos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos (PEREIRA et al., 2016).

Extrato da casca do fruto, utilizado em tratamento de células tumorais *in vitro* apresentou atividades anti-inflamatórias com inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX), especificamente COX -1 e COX-2, e efeitos antitumorais com redução da viabilidade celular tempo dependente (LESCANO et al., 2016). As ações anti-inflamatórias dos compostos fenólicos e flavonoides foram relacionados à inibição das vias de sinalização celular pela inibição de COX-1, enzima também envolvida na agregação plaquetária, mostrando o

seu potencial terapêutico para prevenção e tratamento de doenças associadas à atividade plaquetária (LESCANO et al., 2018). A administração oral de óleo preparado a partir das cascas e sementes do fruto inibiram significativamente a migração de leucócitos e reduziu a dor, edema e inflamação, avaliados em diversos testes, além de não apresentar sinais de toxicidade até a dose de 2g/Kg de peso corpóreo (VISCARDI et al., 2017a). O extrato tanto da casca como do fruto exibiu atividades antiproliferativas e indução a apoptose contra todas as linhagens de células tumorais testadas no estudo de Silva et al (2018), efeitos estes associado à presença de chalconas e flavonas (SILVA et al., 2018).

Os resíduos provenientes da produção industrial de suco do fruto da *Campomanesia adamantium* (guavira ou gabirola), como cascas, restos de polpa e sementes (bagaço) normalmente são desprezados como lixo, no entanto são fontes riquíssimas de nutrientes e fibras alimentares. Na análise das características físicas e químicas, e do conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante, as cascas e sementes apresentaram conteúdo de fibra alimentar em torno de três vezes mais, o dobro em fibra solúvel e quatro vezes mais de fibras insolúveis, em comparação com a polpa da fruta. O teor de fenólicos e a atividade antioxidante nos resíduos também se mostraram superior à sua polpa (MEDEIROS ALVES et al., 2013).

Nas cascas de *C. adamantium* os fenólicos e flavonoides predominantes são quercetina, miricetina, ácido gálico, ácido tânico, catequina e xantina (LESCANO et al., 2016). Os compostos fenólicos estão associados à manutenção da atividade antioxidante de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O extrato da casca é capaz de reduzir atividades das enzimas COX-1 e COX-2, sendo potencial anti-inflamatório, o que é de interesse na carcinogênese, pois a modulação de COX-2 colabora na citotoxicidade contra células malignas (LESCANO et al., 2018).

Segundo Souza et al (2016), a casca da guavira possui propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antidepressiva e baixa toxicidade. Ademais apresenta baixo custo, grande quantidade de fibra alimentar, essencialmente pectina, compostos fenólicos e o aproveitamento das cascas colabora para a

redução do desperdício e acúmulo de lixo biológico (MEDEIROS ALVES et al., 2013).

Flavonóides são substâncias fenólicas hidroxiladas e fitoquímicas que não podem ser sintetizados por seres humanos, sendo adquiridos pela dieta. Possuem ações antioxidantes, antiinflamatória e anticancerígenas. Como antioxidantes, agem na supressão da formação e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS). No sistema imune, grande parte de seu efeito está na biossíntese de citocinas que medeiam a adesão de leucócitos circulantes a locais de lesão. Alguns flavonoides inibem a produção de prostaglandinas, moléculas poderosas na sinalização pró-inflamatória. E quanto aos seus efeitos antitumorais, podem influenciar na *downregulation* da proteína p53 mutante, parada do ciclo celular, inibição da tirosina quinase, inibição das proteínas de choque térmico, ligação do receptor de estrôgenio e inibição da expressão de proteínas Ras (SHASHANK; PANDEY, 2013). Os flavonoides são classificados de acordo com suas estruturas químicas em chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, entre outros. São considerados compostos citoprotetores, pois inibem enzimas envolvidas na proliferação celular e modula a expressão de proteínas envolvidas na apoptose. Parte de suas propriedades antioxidantes se dão pelo estímulo da glutathione-S-transferase (GST), enzima que protege as células dos danos de radicais livres. Os compostos fenólicos atuam na sinalização do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), que está envolvido na regulação da expressão gênica pró-inflamatória, mediando a síntese de várias citocinas, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e COX-2 (LAGO et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio auxiliam na transcrição gênica, transdução de sinais e resposta imune. Entretanto, uma superprodução de radicais livres podem causar danos oxidativos nos lipídeos, proteínas e DNA celulares, o que é associado ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo o câncer (LIU et al., 2018). A proteção contra os radicais livres ocorre pela defesa antioxidante, que compreende moléculas endógenas (vias enzimáticas) e exógenas. Entre as fontes exógenas estão vitaminas com o ácido ascórbico e antioxidantes fenólicos, como os flavonoides (LIGUORI et al., 2018). Esse amparo antioxidante é importante, pois o estresse oxidativo está relacionado com a ativação de ações imunes e de mediadores, induzindo

um estado inflamatório, a princípio benigno e necessário, porém quando crônico acarreta aumento da morbidade. Na inflamação crônica os radicais livres danificam os componentes estruturais das células e as citocinas inflamatórias, como TNF α , ativam o fator de transcrição NF κ B, que induz a expressão de genes envolvidos na proliferação celular, apoptose e carcinogênese. Ademais a inflamação crônica também está associada à angiogênese, outra característica do câncer. E as ROS reagem com o DNA, podendo resultar em parada transcricional, erros de replicação ou instabilidade genômica (LIGUORI et al., 2018).

As fibras dietéticas são compostas por polissacarídeos, que são polímeros de carboidratos não hidrolisados pelas enzimas endógenas no intestino delgado humano, sendo degradadas no cólon por enzimas bacterianas da microbiota, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido acético, butírico e propiônico (WONG; HARRIS; FERGUSON, 2016). Os polissacarídeos participam em diversos processos biológicos, como reserva energética, composição de estrutura, sinalização e comunicação celular. E há evidências de atividades antibióticas, antioxidantes, anticancerígena e estimulação imunológica relacionada a vários polissacarídeos. Tais mecanismos são interessantes na aplicação de terapias oncológicas, pois podem contribuir para a inibição do crescimento tumoral prevenindo a tumorigênese, na potencialização das células de defesa, indução de apoptose de células tumorais e inibição da metástase (ZONG; CAO; WANG, 2012).

Nos últimos anos cresceram as pesquisas (CAO et al., 2010; MEYENBERG et al., 2017a, 2017b; WANG et al., 2015; WU et al., 2011; XIE; ZOU; LI, 2015; ZHANG et al., 2016) com interesses nas ações antitumorais dos polissacarídeos e seus derivados, com resultados positivos, expondo suas capacidades de modulação imune e citotoxicidade tumoral *in vitro* e *in vivo*, aliado as vantagens de menor toxicidade ao organismo com menores custos em comparação aos agentes quimioterápicos convencionais, despertando maior interesse em seus potenciais biológicos (CAO et al., 2010).

A farinha do bagaço de guavira (FBG) foi recentemente caracterizada quanto ao seu conteúdo polissacarídeos (Schneider et al, 2019). Esta farinha possui em sua composição pectinas (correspondente a 8,6% do conteúdo) e

glucoronoxilana (6%). Dos polissacarídeos pécticos foi caracterizada uma arabinana contendo o monossacarídeo β -L-arabinofuranose (β -L-Araf) como unidade terminal, que é de ocorrência rara. Este trabalho de Schneider et al (2019) é o primeiro a caracterizar estruturalmente polissacarídeos de guavira.

Pectinas correspondem a uma família de polissacarídeos complexos presentes na maioria das plantas e lhes confere proteção contra danos mecânicos e perdas ao meio externo. Como fibra alimentar favorece a microbiota colônica e confere proteção sistêmica devido ao fortalecimento do sistema imune. Também exibe propriedades diretas contra as células tumorais de cólon, com aumento da morte celular via apoptose das células mutadas (LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013).

No processo metastático, após uma célula maligna se desprender do seu tecido de origem, ela precisa sobreviver à perda de ancoragem, e a galectina-3 (Gal-3, proteína da família das lectinas que é ligadora de galactosídeos) protege as células neoplásicas contra essa defesa natural do organismo, e também auxilia a adesão das células metastáticas ao endotélio e favorece a angiogênese tumoral. As pectinas são ricas em β -galactose, as quais são antagonistas da Gal-3. O uso de pectina modificada mostrou-se eficaz em limitar metástases, melhorando a ação de drogas citotóxicas, tendo potencial como adjuvante à quimioterapia (GLINSKY; RAZ, 2009). A pectina também exerceu acentuada inibição na proliferação de linhagens celulares de carcinoma de cólon humano e em uma linha celular de eritroleucemia, mas não surtiu efeito em uma linhagem de linfoma de Burkitt. Essas últimas doenças são resultado de deficiência em receptores de galectina, presumindo que o efeito antiproliferativo da pectina é inibir as função da galectina (BERGMAN et al., 2010).

Além das ações diretas pelos seus diversos compostos, os polissacarídeos exercem efeitos prebióticos, com seleção de bactérias benéficas permitindo o equilíbrio da microbiota reduzindo o risco de ativação carcinogênica no cólon, mas também com repercussões sistêmicas, tais como estimulação do sistema imune, proteção hepática, redução dos níveis de triacilglicerois e controle glicêmico. Em relação à imunidade, observações *in vitro* mostraram que as bifidobactérias estimulam a produção de citocinas (TNF- α e IL-6) e moléculas reativas (NO, H₂O₂) por macrófagos (DELZENNE,

2003). Pectinas e xilanas, presentes na FBG, possuem conhecido efeito pré-biótico (CHUNG WSF, MEIJERINK M, ZEUNER B, HOLCK J, LOUIS P, MEYER AS, WELLS JM, FLINT HJ, 2017; JAIN I, KUMAR V, 2015).

Os prebióticos possuem eficácia no tratamento de doenças inflamatórias devido a suas funções na modulação imunitária, estimulada pelos microrganismos colônicos que são produtores naturais de vitaminas do grupo B que aumentam a eficiência do sistema imune, e absorção de vitaminas e minerais além de produção de enzimas, como a esterase, lipase e co-enzimas NAD e NADP. A fermentação das fibras no cólon aumenta a produção de diferentes ácidos graxos de cadeia curta, com aumento da massa fecal, redução do pH do cólon e redução do produtos nitrosos e enzimas fecais, proporcionando melhora ao sistema imunitário (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

Esse fortalecimento imune conferido pelas fibras é reflexo da microbiota intestinal, que possui papel crítico no desenvolvimento de estruturas linfóides organizadas, pois os tecidos do trato gastrointestinal são férteis em células mielóides e linfóides (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON³, 2012). Os prebióticos agem interagindo com os microrganismos locais e com a mucosa intestinal, ocasionando aumento da barreira epitelial, aumento da adesão da flora residente à mucosa inibindo os microrganismos patogênicos, e estimulando a produção de substâncias antimicrobianas e imunomoduladoras (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012). A modulação do sistema imune não ocorre apenas por estímulo inato e adaptativo, mas também por regulação da permeabilidade do epitélio intestinal, secreção de muco e competição no ecossistema bacteriano (LA FATA; WEBER; MOHAJERI, 2018).

É notório que os compostos naturais como frutas, verduras e legumes, associados a hábitos saudáveis de vida, contribuem para a redução do estresse oxidativo, otimizando as funções orgânicas do nosso corpo, consequentemente protegendo contra a carcinogênese. Entretanto uma vez que uma patologia é instalada, perde-se o foco em componentes naturais e inicia-se a busca por compostos purificados, que possuem atividades eficazes contra as células tumorais, para futuramente serem inseridos na indústria farmacêutica. A utilização da farinha de bagaço de guavira (FBG) proposto

neste trabalho teve como intuito principal não isolar e investigar compostos purificados, mas sim verificar como o consumo da farinha bruta contendo uma mistura de polissacarídeos e outros compostos poderia agir sobre o sistema imunitário e sobre o crescimento de tumoral em modelo animal. Como o bagaço do fruto da gabioba é rico em substâncias biologicamente ativas, com grande quantidade de polissacarídeos, espera-se que seja capaz de interferir na resposta imune e, conseqüentemente, no desenvolvimento tumoral. Além disso, é importante novamente ressaltar que o bagaço da fruta é desprezado como resíduo de processo industrial, o que aumenta o interesse de investigar se o consumo da farinha produzida a partir deste resíduo apresenta ações benéficas como sugere a utilização empírica da planta pela população.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da suplementação com farinha do bagaço do fruto de *C. adamantium* sobre crescimento tumoral e parâmetros imunitários em ratos portadores ou não do tumor de Walker 256.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos da suplementação com farinha do bagaço do fruto de *C. adamantium*, durante 15 e 45 dias, através da avaliação dos seguintes parâmetros:

- Determinação da massa corpórea.
- Mensuração da massa tumoral;
- Proliferação *ex vivo* das células tumorais.
- Proliferação de linfócitos obtidos de sangue, timo e linfonodos mesentéricos;
- Funcionalidade de macrófagos peritoneais.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus), obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram submetidos a ciclo invertido claro/escuro (12/12 horas), com temperatura controlada de 22 ± 1 °C, com água e alimentação (Nuvilab AR- Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, PR, BRA, composta por 66% de carboidratos, 23% de proteínas, 4% de lipídios, 6% de fibras e 1% de vitaminas e minerais (PIZATO, 2005) à vontade.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia. Todos os procedimentos envolvendo animais foram iniciados após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPR, sob CEUA n° 1153. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

Grupo C – controle sem suplementação;

Grupo CT – controle com suplementação;

Grupo W – com tumor de Walker 256 subcutâneo, sem suplementação;

Grupo WT – com tumor de Walker 256 subcutâneo, com suplementação.

O resíduo do bagaço das frutas de *C. adamantium* foi processado na forma de farinha na Universidade de Campinas (UNICAMP), sendo fornecido ao Departamento de Bioquímica da UFPR, o qual disponibilizou a FBG para este trabalho. A suplementação foi oferecida na concentração de 63mg/200g de peso corpóreo/dia. A dose individual da farinha do bagaço de guavira (FBG) foi ajustada conforme o peso, mensurado a cada dois dias em balança

digital. O composto foi homogeneizado em água, formando uma pasta semilíquida, sendo administrada por via oral com auxílio de pipeta de plástico tipo Pauster. Para definir a dose a ser oferecida, foram analisados estudos prévios de suplementação com resíduos de frutas, nos quais foram obtidos efeitos benéficos e sem toxicidade (CAZARIN et al., 2014; DA SILVA et al., 2014). Os cálculos foram baseados na quantidade de fibra alimentar presente no composto utilizado e pareado com a mesma quantidade presente nas rações comerciais da espécie de roedores.

Foram realizados 2 modelos experimentais: modelo de 15 dias, e modelo de 45 dias. No modelo de 15 dias, a suplementação dos animais dos grupos CT e WT foi iniciada no mesmo dia em que os animais dos grupos W e WT receberam inoculação subcutânea de células de tumor de Walker 256, e continuou por 15 dias. No modelo de 45 dias, os animais dos grupos CT e WT foram suplementados por 30 dias, no 31º. dia os grupos W e WT receberam inoculação subcutânea de células de tumor de Walker 256, e a suplementação continuou até o 45º dia. Após eutanásia dos animais, os tumores foram removidos e pesados. O sangue foi coletado para obtenção de linfócitos, os macrófagos peritoneais foram coletados e os órgãos linfoides (timo e linfonodos mesentéricos) foram processados para obtenção de linfócitos. Esta sequência de suplementação e obtenção de tecidos dos 4 grupos foi repetida 3 vezes, de forma independente.

3.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE TUMOR DE WALKER PARA INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA

Suspensão de 2×10^7 células de tumor de Walker 256, concentrada em 1 ml, foi injetada via intraperitoneal em um rato macho da linhagem Wistar, com o objetivo de permitir a proliferação das células de tumor de Walker recém descongeladas. Após 5 dias, ao se constatar ascite, o animal sofreu ortotanásia, com posterior injeção de 10 ml de solução tampão fosfato-salina (PBS) na cavidade peritoneal, sendo realizado massagem local e retirado o fluido com auxílio de pipeta de plástico tipo Pauster via laparotomia mediana.

As células tumorais obtidas foram contadas em câmara de Neubauer na presença de azul de tripan, em solução salina 0,9%. Uma concentração de 2×10^7 células/mL foi inoculada por via subcutânea no flanco direito de cada animal dos grupos W e WT. Nos demais grupos, C e CT, foi administrado 1 ml de solução PBS, conforme protocolo descrito por (FERNANDES et al., 1991).

3.4 MASSA TUMORAL

A massa tumoral foi retirada de cada animal e pesada separadamente em balança digital, Denver Instrument Company AA-200®.

3.5 CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE CÉLULAS TUMORAIS

As células tumorais foram obtidas por fragmentação de parte da massa tumoral removida dos diferentes grupos portadores de tumor. Foram cultivados em placas com fundo chato transparente de 96 escavações em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10 % de soro fetal bovino, contendo 0,1 % de antibióticos (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L) no volume de 180 μ L de solução de células contendo 10^4 células/escavação. Foram adicionados 20 μ L/escavação do detector de atividade metabólica Alamar Blue® (Biosource), e as células foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 95% ar / 5% de CO₂ por 72 horas. A determinação da porcentagem de redução do Alamar Blue foi realizada através de leitura colorimétrica. O sistema incorpora um indicador de oxidação-redução que muda de cor em resposta a redução química do meio de crescimento, passando da cor azul para a cor avermelhada. A determinação da absorbância foi realizada pelo leitor multifuncional de microplacas Tecan Infinite® M200 nos momentos, 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento.

3.6 FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS

3.6.1 ISOLAMENTO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Após a eutanásia de cada animal, ocorreu a inoculação de 10 mL de tampão PBS estéril, com pH 7,4 na cavidade peritoneal. Após massagem no peritônio durante 30 segundos, a cavidade foi aberta cuidadosamente, permitindo a entrada de pipeta tipo Pauster de plástico estéril para aspiração do fluido contendo as células. Na sequência, estas células foram centrifugadas (Eppendorf-Centrifuge 5810 R) duas vezes a 322 x g, a 4 °C, durante 05 minutos (BELLO S.R.B, 2007).

3.6.2 AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS

A capacidade de adesão dos macrófagos foi avaliada através do plaqueamento (placa de 96 escavações de fundo chato) de uma solução 2×10^6 cel/mL e adição de 100 µL de PBS. Após incubação por 1 hora as escavações foram lavadas com PBS, e foi adicionado metanol 50% para a fixação das células. Em seguida foi adicionada Giemsa (0,1%) que se manteve em contato com as células por 10 minutos. A placa foi lavada com PBS e o corante foi solubilizado com 200 µL metanol 50%. Realizou-se leitura em leitor de microplacas a 550nm (ROSEN; GORDON, 1987) Os resultados são expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (C) da absorbância/ 10^6 células.

Foi utilizado o método descrito por (BONATTO, 2003) para avaliação da capacidade fagocítica. Foram depositados 100 µL de solução contendo 10^5 células em placa tipo ELISA de 96 escavações. Foram adicionados 20 µL de zimosan corado com vermelho neutro e incubados por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µL de fixador Baker (4% formaldeído, 2% NaCl, 1% acetato de cálcio). Após 30 minutos, a placa foi lavada com PBS e centrifugada a 503 x g a 4 °C por 5 minutos. O vermelho neutro que se encontrava dentro dos fagossomos foi solubilizado utilizando-se 200 µL de solução de extração (10% ácido acético e 40% etanol em água destilada), e após 30 minutos foi realizada a leitura em

leitor de microplacas a 550 nm. Os resultados são expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (C) da absorbância/ 10^6 células.

Para a análise de volume lisossomal de macrófagos, utilizamos o método descrito por (PIPE, R.K.; COLES, J.A.; FARLEY, 1995), no qual em placa do tipo ELISA foram depositados 100 μ L da solução de macrófagos contendo 10^5 células e adicionados 20 μ L de vermelho neutro a 2%. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 503 x g. O sobrenadante foi descartado e, individualmente, cada poço foi lavado com PBS, a fim de eliminar o vermelho neutro que não tinha sido internalizado pelas células. Adicionamos 100 μ L de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro retido dentro dos lisossomos. Isso é possível, visto que o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular, e uma vez presente no lisossomo, fica retido por mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Após 30 minutos, a placa foi lida em leitor de microplacas a 550 nm. Os resultados são expressos como porcentagem em relação ao grupo controle (C) da absorbância/ 10^6 células.

A produção de óxido nítrico foi avaliada segundo método descrito (STUEHR; MARLETTA, 1985). Foram adicionados 2×10^5 células em cada escavação em volume de 200 μ L de meio RPMI. Após incubação por 2 horas em estufa a 37 °C, os poços foram lavados com PBS, e as células foram incubadas por 24 horas em meio RPMI. Após centrifugação por 5 minutos a 503 x g, foram coletados 50 μ L do sobrenadante, aos quais foram adicionados mesmo volume de reagente de Griess (consiste na mistura 1:1 v/v de solução de N—[1-naftil]etilenediamida 0,1% e solução de sulfanilamida 1% em H_3PO_4 5%). Após incubação por 10 minutos a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 550 nm. Curva de calibração foi realizada a partir de solução estoque de nitriti 0,1 M. Os resultados são expressos como porcentagem em relação ao grupo controle (C) da absorbância/ 10^6 células.

3.7 CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS

3.7.1 ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS DO SANGUE, TIMO E LINFONODOS MESENTÉRICOS

Para obtenção de linfócitos do sangue foi utilizado tubo cônico de 15 mL contendo 3 mL de Histopaque 1077 em temperatura ambiente. Sobre o histopaque foram adicionados cuidadosamente 3 mL de sangue heparinizado, e foi realizada centrifugação $400 \times g$ por 40 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, a interface opaca (nuvem contendo células mononucleadas) entre o plasma e o histopaque foi coletada com pipeta tipo Pasteur e transferida para outro tubo cônico de 15 mL. As células foram lavadas com PBS, centrifugadas a $250 \times g$ por 10 minutos, e misturadas a meio de cultura RPMI1640 contendo 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/L) para contagem em câmara de Neubauer.

Os órgãos linfoides (timo e linfonodos mesentéricos) foram mantidos em meio de cultura RPMI e macerados com auxílio de embolo de seringa e peneira de malha fina, em placa de Petri. Para cada grupo de animais foi obtido *pool* de linfócitos de cada órgão. O conteúdo macerado de linfonodos mesentéricos e timo foi filtrado em papel filtro apropriado e centrifugado a $250 \times g$, durante 5 minutos. Os precipitados foram lavados com PBS por mais duas vezes, e o último sedimentado foi suspenso em meio de cultura RPMI1640 contendo 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/L). Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer.

3.7.2 CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS

Os linfócitos obtidos do sangue, timo e linfonodos mesentéricos dos diferentes grupos foram cultivados em placas com fundo transparente de 96 escavações em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, contendo 0,1% de antibióticos (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L). Foram adicionados 160 μ L de solução de células contendo 5×10^4 células/escavação, estimuladas ou não com 20 μ L/escavação do mitógeno Concanavalina A (Con A-5 μ g/m) ou ou LPS (Lipopolissacarídeo

de *E. coli*). Vinte microlitros por escavação do detector de atividade metabólica Alamar Blue® (Biosource) foram adicionados em todas as escavações, e as células foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 95% ar / 5% de CO₂ por 72 horas. A determinação da capacidade proliferativa foi realizada através de leitura da absorbância, uma vez que o sistema incorpora um indicador de oxidação-redução que muda de cor em resposta a redução química do meio de crescimento, passando da cor azul para a cor avermelhada. A determinação da absorbância foi feita pelo leitor multifuncional de microplacas Tecan infinite® M200 nos momentos, 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foram submetidos à análise de variância de duas vias, tendo como fatores o tumor e suplementação, seguido de pós-teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o Graph Pad Prism® 7.

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS TUMORAIS

Após 15 (modelo de 15 dias) e 45 dias (modelo de 45 dias) da inoculação tumoral e início da suplementação com a farinha do bagaço de guavira (FBG) (Figuras 1 e 2), não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos no que diz respeito ao peso dos animais ($p>0,05$).

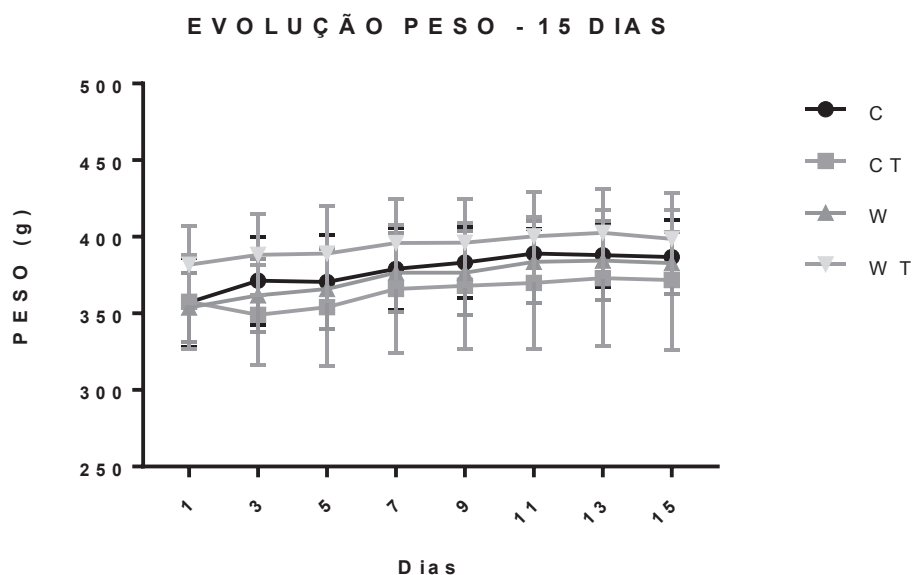


Figura 1: Evolução do peso corpóreo dos animais (modelo de 15 dias). Grupos C (sem tumor, sem suplementação), CT (sem tumor suplementado com FBG), W (com tumor sem suplementação) e WT (com tumor suplementado com FBG).

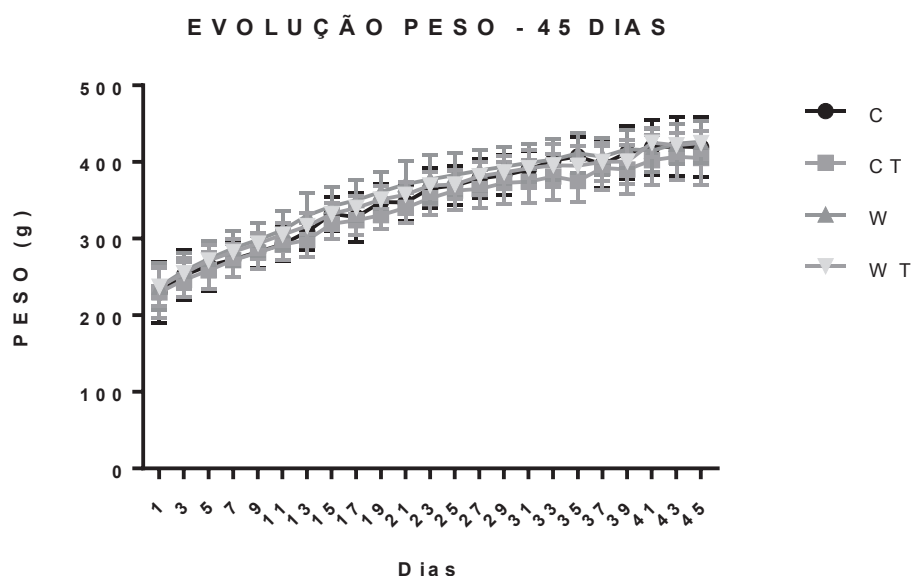


Figura 2: Evolução do peso corpóreo dos animais (modelo de 45 dias). Grupos C (sem tumor, sem suplementação), CT (sem tumor suplementado com FBG), W (com tumor sem suplementação) e WT (com tumor suplementado com FBG).

Em relação ao crescimento do tumor de Walker 256 subcutâneo, não foi observada diferença entre os grupos W ($7,5 \text{ g} \pm 5,0$) e WT ($7,7 \text{ g} \pm 2,4$) quando o experimento de 15 dias foi realizado (Figura 3A). Quando a capacidade proliferativa das células tumorais foi analisada também não houve diferença entre os grupos W e WT nos 3 tempos de cultivo *ex vivo* avaliados (Figura 3B).

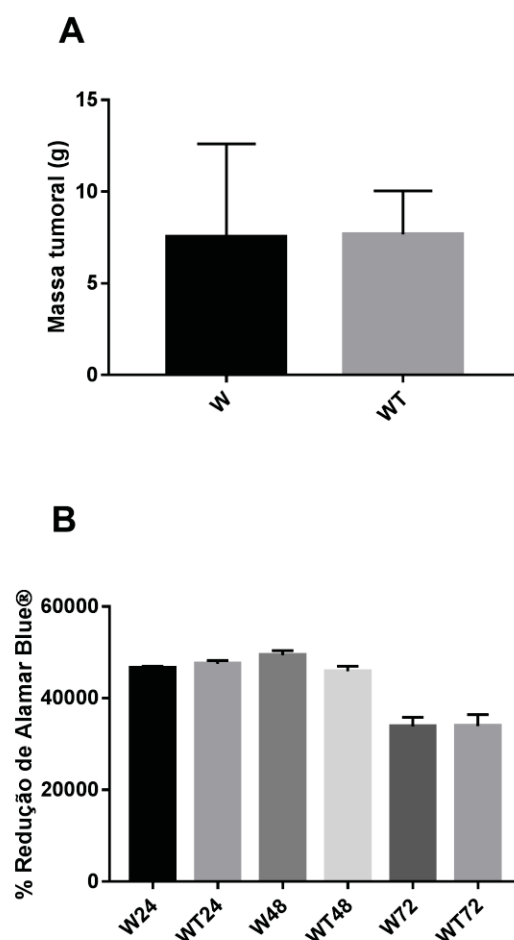


Figura 3: Massa tumoral *in vivo* (A) e proliferação de células de tumor de Walker 256 *ex vivo* após 24, 48 e 72 h (B) de ratos submetidos ao experimento de 15 dias, separados nos grupos W (com tumor e não suplementado) e WT (com tumor suplementado com FBG.). n = 15 animais/grupo.

No entanto, quando foi realizado o experimento de 45 dias foi observado que o grupo WT ($2,5 \text{ g} \pm 0,6$) apresentou tumores com massa cerca de 70% menor que os tumores do grupo W ($9,3 \text{ g} \pm 2,3$) (Figura 4A), e a capacidade proliferativa das células tumorais também reduziu cerca de 40% no grupo WT em relação a W, em todos os tempos de cultivo *ex vivo* analisados (Figura 4B).

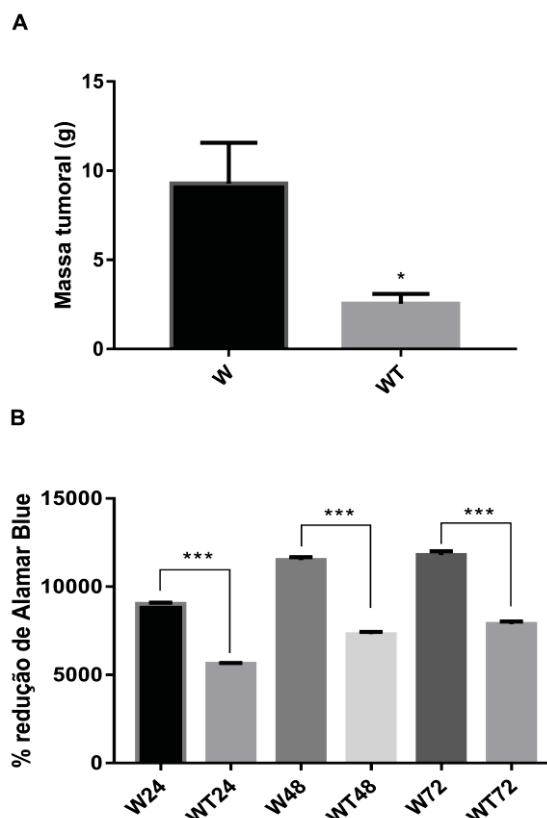


Figura 4: Massa tumoral *in vivo* (A) e proliferação de células de tumor de Walker 256 *ex vivo* após 24, 48 e 72 h (B) de ratos submetidos ao modelo de 45 dias, separados nos grupos W (com tumor e não suplementado) e WT (com tumor suplementado com FBG). n = 15 animais/grupo. *** p<0,0001.

4.2 PARÂMETROS IMUNITÁRIOS

4.2.1 ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS

A análise da imunidade inata ocorreu pela avaliação da funcionalidade dos macrófagos peritoneais. Observamos respostas imunes interessantes, com efeitos positivos nos grupos que receberam a suplementação com a FBG por 15 dias. Conforme mostrado na Figura 5A, nos animais suplementados houve aumento significativo na adesão dos macrófagos, sendo um aumento de 7% entre os grupos C ($98,8 \% \pm 2,0$) e CT ($107,8 \pm 3,4$). E quanto aos animais com tumor, houve um aumento de 15% de adesão nos animais tratados (WT, $119,5 \% \pm 4,6$), em comparação com o grupo W ($104,4 \% \pm 2,1$).

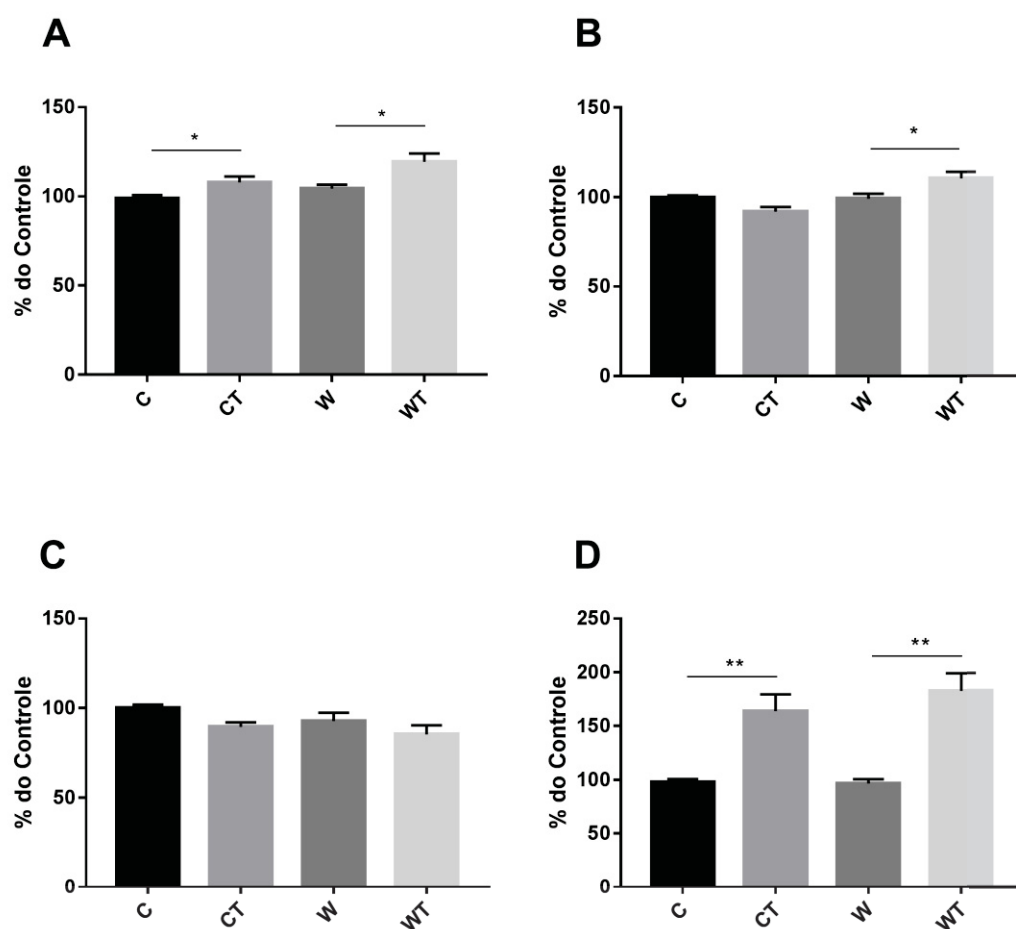


Figura 5: Capacidade de adesão (A), capacidade fagocítica (B), retenção lisossomal (C) e produção de óxido nítrico (D) de macrófagos de ratos submetidos ao experimento de 15 dias, separados nos grupos C, controle; CT, controle suplementado com FBG; W, com tumor de Walker 256 não suplementado; e WT, com tumor de Walker 256 suplementado com FBG. n=15 animais/grupo. * p<0,05; ** p<0,001.

A capacidade fagocítica dos macrófagos (Figura 5B) do grupo C (99,7 % \pm 1,3) e CT (91,9 % \pm 2,6) foi similar ($p>0,05$), entretanto nos grupos portadores de tumor, encontramos um aumento da fagocitose nos animais tratados (WT, 110,4% \pm 3,6) de 10% em relação ao grupo W (99,1 % \pm 2,6; $p<0,05$). Quanto à retenção lisossomal, na Figura 5C, não encontramos variações entre os grupos (C, 100 % \pm 1,9; CT, 89,6 % \pm 2,5; W, 92,9 % \pm 4,6; WT, 85,3 % \pm 5,1).

A Figura 5D apresenta os resultados relativos à capacidade de produção de óxido nítrico pelos macrófagos. A quantidade de NO produzida aumentou em 66% no grupo CT (163,9 % \pm 15,6) em comparação com o grupo C (97,8 % \pm 2,9). E no grupo WT (182,5 % \pm 16,5) também houve aumento de 85% em relação ao grupo não suplementado W (96,6 % \pm 4,0).

Os macrófagos estudados no presente trabalho foram obtidos da cavidade peritoneal dos animais, no entanto, considerando a proximidade da massa tumoral da cavidade peritoneal, pode ser considerado a possibilidade de os macrófagos intratumorais também apresentarem o mesmo comportamento observado no nosso ensaio sob a influência da suplementação com FBG por 15 dias.

O modelo de 45 dias promoveu respostas diferentes dos macrófagos peritoneais (Figura 6). A capacidade de adesão (Figura 6A) seguiu perfil de resposta similar a do modelo de 15 dias. A adesão dos macrófagos do grupo WT ($114,1 \% \pm 2,6$) elevou-se $\sim 14\%$ em relação ao grupo CT ($100,1 \% \pm 1,7$; $p < 0,001$). Foi observado também incremento de $\sim 10\%$ no grupo W ($111,1 \% \pm 2,1$) em relação ao grupo C ($99,95 \% \pm 1,5$; $p < 0,05$).

A capacidade fagocítica, retenção lisossomal e produção de NO (Figuras 6B, 6C e 6D, respectivamente) dos macrófagos no modelo de 45 dias apresentaram respostas diferentes quando comparadas às do modelo de 15 dias. Enquanto no modelo de 15 dias o grupo WT apresentou valor similar ou aumentado em relação a W, no modelo de 45 dias houve redução em relação a W. Macrófagos do grupo WT ($90,6 \% \pm 1,3$) do modelo 45 dias fagocitaram $\sim 8\%$ menos que os do grupo W ($98,4 \% \pm 1,4$; $p < 0,0001$), retiveram $\sim 15\%$ menos lisossomos (W, $92,1 \% \pm 2,6$; WT, $77,9 \% \pm 2,8$; $p < 0,01$) e produziram $\sim 40\%$ menos óxido nítrico (W, $166,8 \% \pm 3,1$; WT, $96,1 \% \pm 3,6$; $p < 0,0001$). Animais sem tumor suplementados com FBG (grupo CT) apresentaram leve aumento da capacidade fagocítica macrofágica em relação ao grupo C ($\sim 7\%$; $p < 0,05$; C, $100,0 \% \pm 1,2$; CT, $107,3 \% \pm 1,4$), e grande aumento da produção de NO ($\sim 100\%$; $p < 0,0001$; C, $95,0 \% \pm 3,2$; CT, $206,2 \% \pm 4,6$).

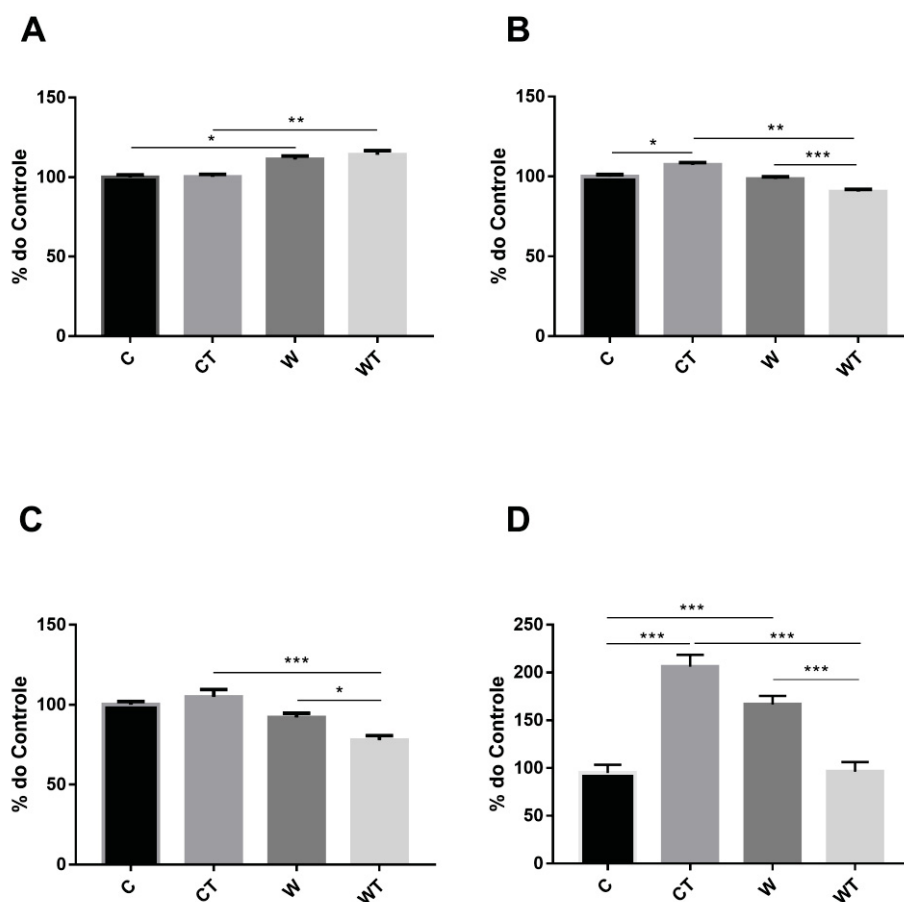


Figura 6: Capacidade de adesão (A), capacidade fagocítica (B), retenção lisossomal (C) e produção de óxido nítrico (D) de macrófagos de ratos submetidos ao experimento de 45 dias, separados nos grupos C, controle; CT, controle suplementado com FBG; W, com tumor de Walker 256 não suplementado; e WT, com tumor de Walker 256 suplementado com FBG. n=15 animais/grupo. * p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001.

4.2.2 PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

As Figuras 7A e 7B mostram a proliferação de linfócitos de sangue de animais do modelo de 15 dias, estimulados *ex vivo* com Concanavalina A (ConA) e lipopolisacarídeo (LPS), respectivamente. A ConA é um potente estímulo para a proliferação de linfócitos T, enquanto LPS, para linfócitos B. Sob estímulo de ConA (Figura 7A) não houve diferença significativa observada entre os grupos ($p > 0,05$).

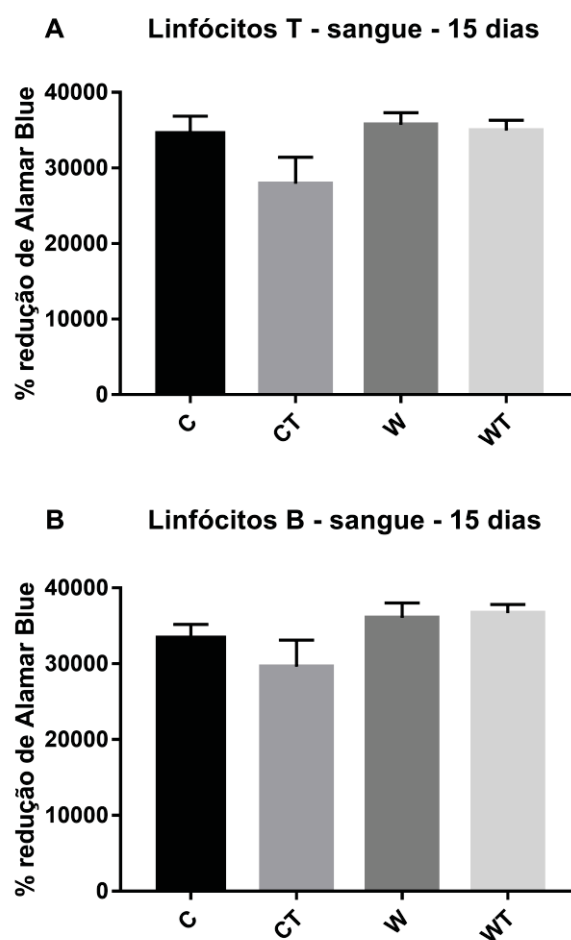


Figura 7: Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos do sangue de ratos submetidos ao modelo de 15 dias, separados nos grupos C, controle; CT, controle suplementado com FBG; W, com tumor de Walker 256 e WT, com tumor de Walker 256 suplementado com FBG. Mitógenos utilizados foram Concanavalina A (A) e Lipopolissacarídeo de *E. coli* (B). A proliferação linfocitária é diretamente proporcional a % de Redução do Alamar Blue®. n = 16.

Ao analisarmos a proliferação linfocitária de órgão linfoide primário, os linfócitos do timo (Figuras 8A e 8B) apresentaram padrão semelhante de resposta para linfócitos T (ConA) e B (LPS). Linfócitos do grupo W apresentaram acentuada redução da capacidade proliferativa em relação ao grupo C (~70%), enquanto os linfócitos do grupo WT apresentaram manutenção da capacidade proliferativa semelhante à dos animais sem tumor.

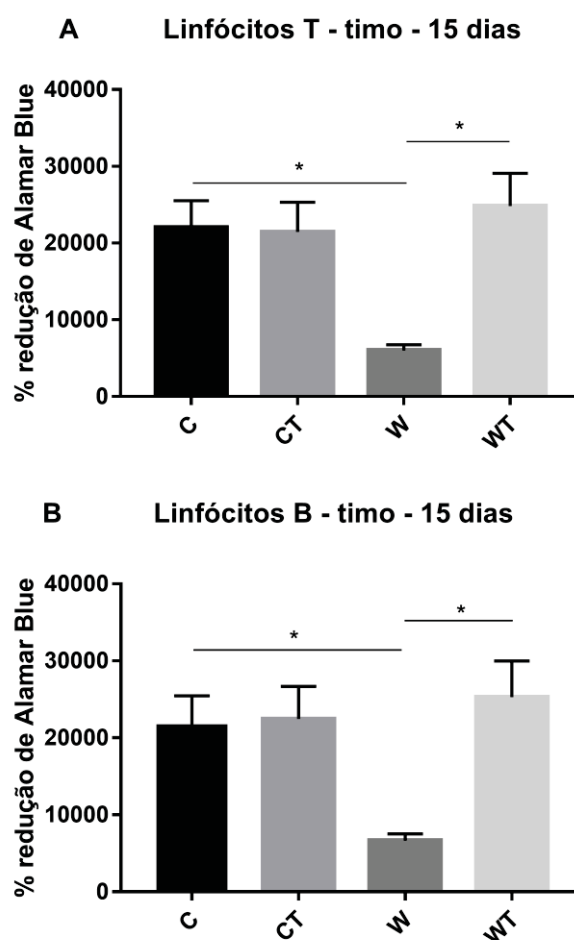


Figura 8: Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos do timo de ratos submetidos ao modelo de 15 dias, separados nos grupos C, controle; CT, controle suplementado com FBG; W, com tumor de Walker 256 e WT, com tumor de Walker 256 suplementado com FBG. Mitógenos utilizados foram Concanavalina A (A) e Lipopolissacarídeo de *E. coli* (B). A proliferação linfocitária é diretamente proporcional a % de Redução do Alamar Blue®. n = 16. * p<0,05.

Quanto à proliferação obtida dos linfócitos de linfonodos mesentéricos, órgãos linfoides secundários (Figuras 9A e 9B), verificamos perfil de resposta semelhante aos linfócitos do timo, havendo queda da proliferação do grupo W em relação ao C (~70%), a qual foi prevenida nos animais com tumor tratados com FBG (WT). Linfócitos B de animais do grupo CT apresentaram redução da proliferação em relação aos do grupo C (~40%).

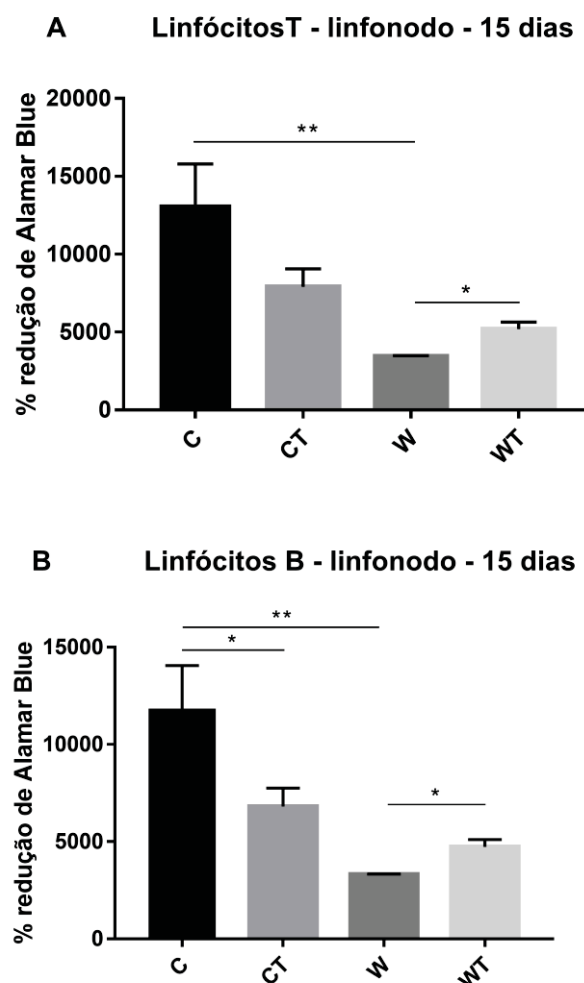


Figura 9: Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos de linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao modelo de 15 dias, separados nos grupos C, controle; CT, controle suplementado com FBG; W, com tumor de Walker 256 e WT, com tumor de Walker 256 suplementado com FBG. Mitógenos utilizados foram Concanavalina A (A) e Lipopolissacarídeo de *E. coli* (B). A proliferação linfocitária é diretamente proporcional a % de Redução do Alamar Blue®. n = 16. * p<0,05, ** p<0,001.

No modelo de 45 dias o perfil de resposta linfocitária foi diferente do apresentado no modelo de 15 dias. Linfócitos T e B do sangue de animais do grupo WT no modelo de 45 dias (Figura 10) apresentaram redução de proliferação quando comparados a linfócitos do grupo W (~20%), assemelhando-se à proliferação de animais sem tumor. Linfócitos B do sangue do grupo CT apresentaram pequena redução da proliferação em relação a C (~10%).

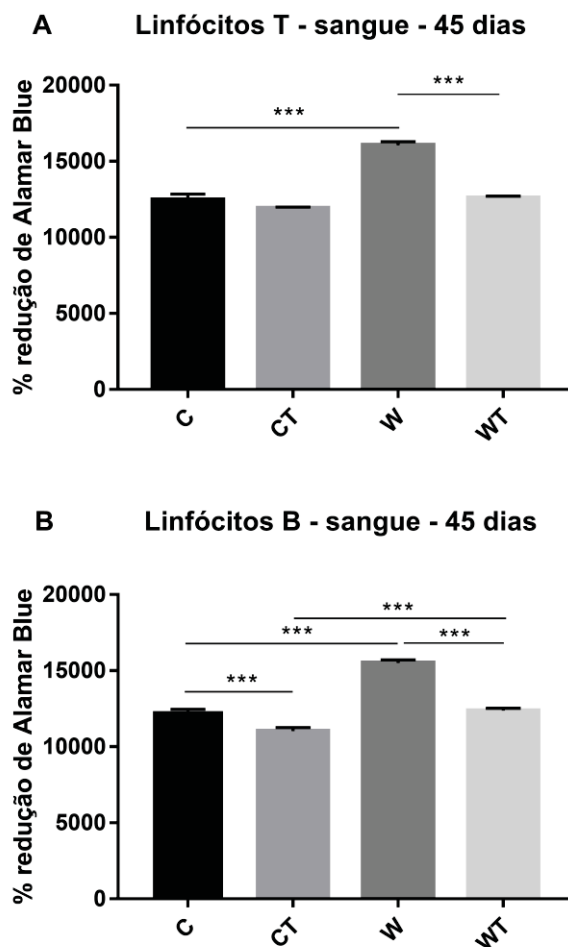


Figura 10: Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos de sangue de ratos submetidos ao modelo de 45 dias, separados nos grupos C, controle; CT, controle suplementado com FBG; W, com tumor de Walker 256 e WT, com tumor de Walker 256 suplementado com FBG. Mitógenos utilizados foram Concanavalina A (A) e Lipopolissacarídeo de *E. coli* (B). A proliferação linfocitária é diretamente proporcional a % de Redução do Alamar Blue®. n = 16. *** p<0,0001.

Linfócitos T e B do timo do grupo WT, diferentemente de linfócitos do sangue, mantiveram resposta proliferativa semelhante à do grupo W, mas superior à do grupo CT (~40%) (Figura 11). Adicionalmente, linfócitos T do grupo CT apresentaram redução da proliferação em relação a C (~20%).

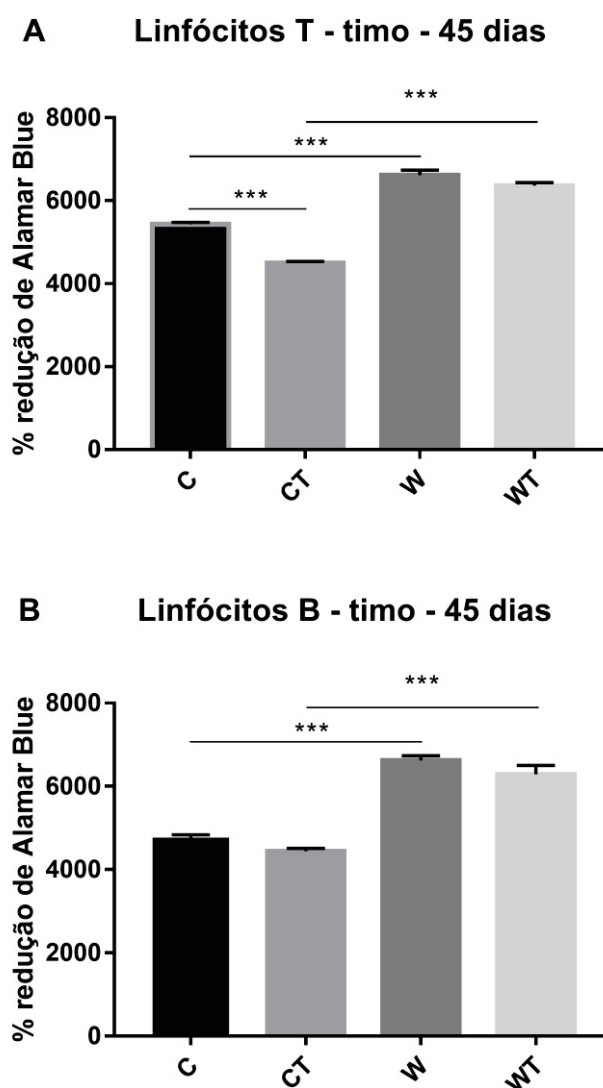
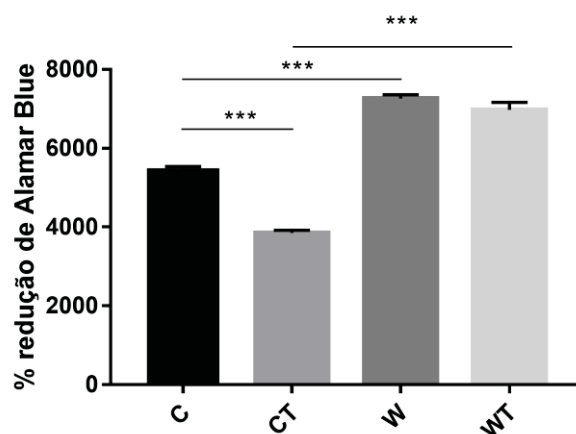


Figura 11: Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos de timo de ratos submetidos a modelo de 45 dias, separados nos grupos C, controle; CT, controle suplementado com FBG; W, com tumor de Walker 256 e WT, com tumor de Walker 256 suplementado com FBG. Mitógenos utilizados foram Concanavalina A (A) e Lipopolissacarídeo de *E. coli* (B). A proliferação linfocitária é diretamente proporcional a % de Redução do Alamar Blue®. n = 16. *** p<0,0001.

Linfócitos T e B de linfonodos mesentéricos apresentaram resposta similar a dos linfócitos do timo, com resposta dos grupos WT e W similares, e redução da proliferação de linfócitos T e também B do grupo CT em relação ao grupo C (Figura 12).

A Linfócitos T - linfonodo - 45 dias



B Linfócitos B - linfonodo - 45 dias

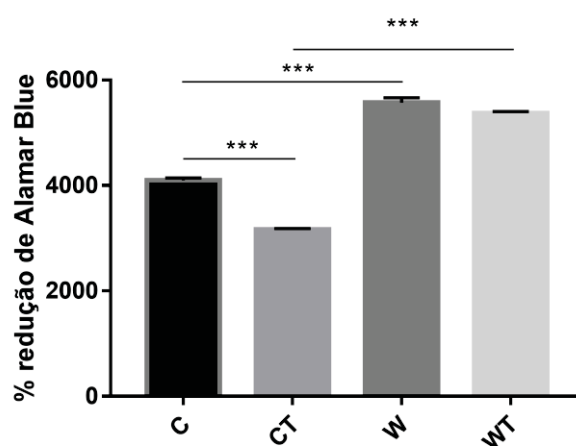


Figura 12: Proliferação de linfócitos T (A) e B (B) obtidos de linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao modelo de 45 dias, separados nos grupos C, controle; CT, controle suplementado com FBG; W, com tumor de Walker 256 e WT, com tumor de Walker 256 suplementado com FBG. Mitógenos utilizados foram Concanavalina A (A) e Lipopolissacarídeo de *E. coli* (B). A proliferação linfocitária é diretamente proporcional a % de Redução do Alamar Blue®. n = 16. *** p<0,0001.

A Tabela 1 a seguir reúne os resultados obtidos nos 2 modelos, de 15 e 45 dias.

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos

| | Modelo 15 dias | | Modelo 45 dias | |
|-------------------------------------|----------------|----|----------------|----|
| | CT | WT | CT | WT |
| TUMOR | | | | |
| Massa tumoral | | - | | ↓ |
| Proliferação tumoral | | - | | ↓ |
| MACRÓFAGOS | | | | |
| Adesão | ↑ | ↑ | - | - |
| Fagocitose | - | ↑ | ↑ | ↑ |
| Retenção lisossomal | - | - | - | ↓ |
| Óxido nítrico | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ |
| PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T | | | | |
| Sangue | - | - | - | ↓ |
| Timo | - | ↑ | ↓ | - |
| Linfonodos mesentéricos | - | ↑ | ↓ | - |
| PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS B | | | | |
| Sangue | - | - | ↓ | ↓ |
| Timo | - | ↑ | - | - |
| Linfonodos mesentéricos | - | ↑ | ↓ | - |

Resultados obtidos para o grupo CT são referentes ao grupo C (não mostrado), e para WT são referentes a W (não mostrado). O sinal (-) indica ausência de diferença, ↑ aumento e ↓ redução do parâmetro/atividade indicada.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, farinha do bagaço de guavira (FBG) foi administrada em dois diferentes modelos: 1) modelo de 15 dias, em que FBG foi dada a animais simultaneamente ao crescimento subcutâneo do tumor de Walker 256 na tentativa de verificar se durante o curto período de 15 dias, a ingestão da farinha seria capaz de interferir no sistema imunitário e no crescimento tumoral; 2) modelo de 45 dias, em que FBG foi dada aos animais durante 30 dias antes da inoculação tumoral e durante o crescimento do tumor. Observou-se que os principais efeitos no modelo de 15 dias foram sobre sistema imunitário, inato e adaptativo, e não sobre o crescimento tumoral. Já no modelo de 45 dias os efeitos foram sobre sistema imunitário e tumor.

O protocolo utilizado neste trabalho, com inoculação subcutânea de células de tumor de Walker 256, objetivou gerar crescimento tumoral e investigar as possíveis influências que a suplementação com FBG poderia exercer sobre a capacidade proliferativa das células tumorais. Tumores de Walker 256 subcutâneos possuem um período de crescimento em torno de 10 dias, sem ocasionar distúrbios fisiológicos aparentes. Esse equilíbrio é rompido repentinamente por um período de crescimento rápido, com instauração de caquexia e alterações metabólicas marcantes no hospedeiro, até a eventual morte do animal, que ocorre em média no 15º dia pós-inoculação (TOGNI et al., 2009).

Nossos dados indicaram que a suplementação com FBG, seja por 15 ou 45 dias, não interferiu na evolução do peso corpóreo (Figuras 1 e 2).

No modelo de 15 dias as massas dos tumores dos animais do grupo W foram semelhantes às do grupo WT, indicando que não houve influência da suplementação com FBG sobre o crescimento tumoral. Isso se confirma em relação à capacidade proliferativa das células tumorais, pois houve semelhança de resposta entre o grupo W e WT nos 3 tempos analisados (Figura 3).

No entanto, quando FBG foi administrada por 30 dias antes da inoculação tumoral e mantida por mais 15 dias durante o crescimento das

células de Walker 256 (modelo de 45 dias), a massa dos tumores do grupo WT reduziu ~70% em relação ao grupo W (Figura 4A). Esta redução da massa pode ser atribuída em parte à redução da proliferação das células tumorais observadas nos 3 tempos analisados (~40% de redução em WT vs W) (Figura 4B).

Outros estudos que investigaram os efeitos de diversos extratos de *C. adamantium* sobre células tumorais obtiveram ações antitumorais pela associação da inibição da proliferação celular e a indução de apoptose. Tais como o uso de extrato do fruto de *C. adamantium in vitro* contra linhagens celulares de melanoma (B16F10), em que houve ações antiproliferativas e pró-apoptóticas registradas. Esses efeitos foram correlacionados aos seus compostos bioativos, principalmente as chalconas. O extrato do fruto induziu a apoptose das células via ativação da caspase-3 e inibiu a proliferação celular. Foi observada também redução da produção de NO por macrófagos cultivados na presença do extrato (LIMA E SILVA et al., 2018). Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por estes autores, pois observamos redução da proliferação das células tumorais e redução da produção de NO por macrófagos peritoneais no modelo de 45 dias.

Quanto aos extratos aquosos das folhas e raízes da guavira avaliados *in vitro* contra células leucêmicas humanas, ambos atuaram induzindo apoptose tardia (CAMPOS et al., 2017). Já a atuação de cardomonina isolada das folhas de guavira, com ação em células de câncer de próstata exibiu atividades antiproliferativas e apoptóticas, pela inibição da via NF-kB. Essa via estimula a liberação de fatores de crescimento, favorecendo o desenvolvimento tumoral, além de agir na regulação de respostas imunes e inflamatórias (PASCOAL et al., 2014).

A falta de influência da suplementação com FBG sobre a massa tumoral e sobre a proliferação das células tumorais no modelo de 15 dias foi possivelmente em função do curto período de suplementação, uma vez que no modelo de 45 dias a redução da massa tumoral e da proliferação das células tumorais *ex vivo* foi intensa. Na FBG estão presentes compostos fenólicos e flavonoides, e extratos da fruta obtidos com diferentes solventes são ricos nestes compostos. Há trabalhos na literatura apontando efeitos antitumorais de extratos obtidos da fruta de *C. adamantium* como, por

exemplo, o de PASCOAL et al. (2014) que observaram efeito antiproliferativos do extrato etanoico dos frutos de *C. adamantium in vitro* sobre células tumorais de próstata. Estudo semelhante foi desenvolvido por (SILVA et al., 2018), os quais verificaram efeito pró-apoptótico do composto dimetilchalcona obtido de extrato diclorometanólico de polpa de guavira sobre células de melanoma murino (B16F10). Na FBG há também fibras alimentares, mais especificamente polissacarídeos. Vários trabalhos indicam efeito antitumoral de polissacarídeos obtidos de fontes vegetais (LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013; TAMIELLO et al., 2018).

Entretanto, mesmo diante de curto tempo de suplementação (15 dias), e da falta de influência sobre o crescimento tumoral, foram obtidas diferenças estatísticas interessantes nos ensaios com células de defesa, revelando capacidade de modulação da FBG sobre o sistema imunitário. Houve maior capacidade de adesão dos macrófagos e maior produção de óxido nítrico nos grupos tratados com e sem tumor, e aumento da capacidade fagocítica no grupo tratado com tumor.

A capacidade de fagocitar e produzir moléculas antitumorais como o NO envolvem a capacidade de adesão de macrófagos. Sob a influência de quimiocinas, macrófagos são recrutados e migram para sítios contendo células tumorais e inflamação, e então exercem seus efeitos antitumorais. O tratamento dos ratos com e sem tumor com FBG (grupos WT e CT, respectivamente) no modelo de 15 dias promoveu aumento da adesão dos macrófagos, indicando efeito de aumento da atividade destas células. Outros trabalhos com polissacarídeos têm demonstrado efeito semelhante sobre adesão macrofágica (GENG et al, 2017).

Capacidade fagocítica e capacidade de retenção lisossomal são parâmetros supostamente relacionados de forma direta, uma vez que quanto maior a quantidade de material fagocitado, teoricamente maior deve ser a quantidade de fagolisossomas formados. No entanto, a literatura mostra que esta relação não é direta desta forma. Ao se observar a Figura 5B (capacidade fagocítica) e a Figura 5C (capacidade de retenção lisossomal), é possível notar que nem sempre as respostas são equivalentes. As células fagocíticas possuem diversos receptores de membrana envolvidos nas atividades de interação celular, os quais, dentre outras coisas, levam ao

reconhecimento e ativação dessas células (STOUT; SUTTLES, 2005) para o processo de fagocitose, no qual a ligação de receptores de membrana promove a polimerização de filamentos de actina, formando o fagossomo. Na sequência, os eventos que seguem são fusões de fagossomos com lisossomas, gerando estruturas denominadas fagolisossomas (AMER; SWANSON, 2002). São tais estruturas que são aferidas nas análises de capacidade fagocítica. No entanto, a maior capacidade celular de retenção lisossomal de patógenos e partículas não é diretamente relacionada à capacidade fagocítica de fagócitos. Enquanto a capacidade fagocítica avalia a avidez dos fagócitos em englobar componentes antígenos, a capacidade de retenção lisossomal mensura o arsenal de lisossomos existente nas células, indicando o quanto de lisossomos encontra-se disponível para a fusão com as partículas a serem endocitadas, bem como o quanto de lisossomas podem ter sido consumidos pela atividade celular. No presente trabalho observou-se que a suplementação dietética com FBG por 15 dias em animais portadores de tumor (grupo WT) promoveu aumento da fagocitose dos macrófagos em relação ao grupo não tratado (W), sem, no entanto, haver alteração no volume lisossomal.

Também houve resultados relevantes no estímulo da capacidade de produção de óxido nítrico no modelo de 15 dias, com aumento de 66% no grupo CT em comparação com o grupo C. E no grupo WT, aumento de 85% em relação ao grupo não suplementado W. Os macrófagos são primordiais à defesa do organismo, neutralizando agressores, como patógenos, corpos estranhos, células mutadas, entre outros. Contra tumores são fagócitos notáveis e secretores de citotoxinas antitumorais como NO, que além de recrutar e ativar a defesa inata estimula a resposta adaptativa (BELO et al., 2010; VAROL; MILDNER; JUNG, [s.d.]).

O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos é associado ao estado de inflamação. Sabe-se que os macrófagos teciduais possuem plasticidade para adaptar-se às mudanças do ambiente com ativação bipolar, podendo haver macrófagos classicamente ativados (M1) com predomínio de ações pró-inflamatórias e os alternativamente ativados (M2) que são anti-inflamatórios. Desta forma, os macrófagos dispõem de capacidades antagônicas com atuação tanto no

combate quanto na progressão tumoral, dependendo da influência do meio (DOMBLIDES; LARTIGUE; FAUSTIN, 2018; JANSSEN et al., 2017; RHEE, 2016; VAROL; MILDNER; JUNG, [s.d.]). A elevação dos níveis de óxido nítrico no grupo com tumor tratado (WT) no modelo de 15 dias reflete um efeito protetor da FBG na defesa contra o tumor, uma vez que substâncias citotóxicas tais como espécies reativas de oxigênio, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, são características de macrófagos polarizados em M1 (CASSETTA; CASSOL; POLI, 2011). Em outras palavras, a resposta macrofágica do tipo M1 é bem-vinda em um cenário com presença de células tumorais, apesar de não ter sido demonstrada redução na massa tumoral de ratos WT no modelo de 15 dias.

A ingestão de produtos naturais popularmente mostra-se como uma via alternativa menos tóxica e financeiramente atraente, com propriedades capazes de melhorar a imunidade do organismo, auxiliando no combate às doenças (JOHANSEN, 2006). Considerando os macrófagos células que patrulham todo o organismo e dotados de diversos receptores de membrana com capacidade de identificar uma gama de antígenos, diversos nutracêuticos disponíveis em nossa dieta são capazes de estimular e ativar tais células. Há crescentes estudos correlacionando componentes dietéticos, como os polissacarídeos e suas capacidades imunomoduladoras, com melhora do desempenho das ações antioxidantes e antitumorais (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; WANG et al., 2016; WATZL; GIRRBACH; ROLLER, 2005; WEI; CHEN; CHEN, 2018).

De fato, polissacarídeos derivados de vegetais são capazes de ativar macrófagos, com variedade de respostas, como a produção de citocinas e quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e quimiotaxia de mais células de defesa aos locais de agressão tecidual. Tais ações foram encontradas na avaliação de 35 espécies de plantas, em que 22 espécies mostraram otimização das funções dos macrófagos (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Em estudo averiguando a influência de um exopolissacarídeo derivado do fungo *Trichoderma pseudokoningii* obteve-se *in vitro* potente atividade imunoestimulatória, com ativação dos macrófagos aumentando os níveis de NO, TNF α e IL-1 pela ativação da via de sinalização NF-KB (WANG et al., 2016). Essas mesmas ações foram identificadas com o polissacarídeo fúngico

isolado do micélio de *Rhizopus nigricans* (WEI; CHEN; CHEN, 2018). Investigação *in vitro* de polissacarídeos derivados de líquens em macrófagos indicou que consistentemente houve melhora da fagocitose e regulação da produção de NO (SHRESTHA; CLAIR; NEILL, 2014). Importante notar que, diferente destes estudos, neste trabalho a FBG contendo polissacarídeos vegetais foi ingerida, ou seja, os polissacarídeos não entraram em contato direto com os macrófagos. Sabe-se que a FBG é composta por pectinas e glucuronoxilana (SCHNEIDER; IACOMINI; CORDEIRO, 2019), ambos polissacarídeos considerados fibras alimentares por não serem digeridos por enzimas de mamíferos. No entanto, resposta de estimulação macrofágica foi obtida, mesmo com a ingestão tendo sido por curto período. Os mecanismos envolvidos nesta ativação “indireta” dos macrófagos ainda estão sob investigação, mas efeitos positivos da ingestão de polissacarídeos não digeríveis (fibras) têm sido relatados em diversos trabalhos. Ingestão de pectina rica em arabinana de acerola (*Malpighia emarginata*) durante 28 dias por camundongos aumentou o tempo de natação dos animais e elevou a capacidade respiratória mitocondrial de células musculares esqueléticas, indicando efeito contra fadiga da pectina (KLOSTERHOFF et al., 2018). TAMIELLO et al. (2018) observaram redução de tumor sólido de Erlich semelhante à redução promovida pelo quimioterápico metotrexato após ingestão por 21 dias de polissacarídeos solúveis não-digeríveis obtidos da fruta jambo (*Syzygiumjambos* (L.) Alston).

Os mecanismos pelos quais polissacarídeos não digeríveis atuam sobre células do sistema imune a partir do intestino foram sugeridos na publicação de VOS et al. (2007). Estas moléculas podem 1) promover ativação ou bloqueio de receptores localizados nas células epiteliais do intestino do hospedeiro que estão diretamente ligados a respostas imunes; 2) gerar metabólitos após fermentação por enzimas bacterianas que podem ser absorvidos e atuar sistemicamente; 3) ligar-se em receptores de células dendríticas modulando suas funções (sabe-se que células dendríticas da lâmina própria emitem prolongamentos em direção ao lúmen do intestino e ali são capazes de endocitar partículas e migrar para linfonodos mesentéricos, modulando assim respostas imunitárias); 4) ligar-se em receptores de células

M ou ser endocitadas por elas, afetando em seguida células imunes como linfócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas.

No modelo de 45 dias os animais com tumor suplementados com FBG (grupo WT) tiveram a adesão de macrófagos aumentada em relação ao grupo CT (Figura 6A). Neste modelo houve redução da retenção lisossomal, da produção de NO e da capacidade fagocítica de macrófagos do grupo WT em relação a W, diferente do que foi observado no modelo de 15 dias. Aparentemente esta redução de funcionalidade dos macrófagos no modelo de 45 dias não comprometeu a redução do crescimento tumoral, sugerindo que o efeito da FBG tenha sido diretamente sobre as células tumorais. Como mencionado anteriormente, outros estudos mostraram efeito de redução da proliferação de células tumorais e aumento de apoptose promovido pelo extrato de fruto de *C. adamantium* (LIMA E SILVA et al., 2018; CAMPOS et al, 2017; PASCOAL et al, 2014).

No modelo de 15 dias a funcionalidade de macrófagos foi aumentada pela suplementação na presença (W vs WT) e na ausência de tumor (C vs CT). A ingestão de FBG por animais sem tumor (grupo CT) promoveu aumento da adesão e da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais *ex vivo*. Este efeito imunomodulatório da FBG em animais sem tumor sugere que o seu consumo, mesmo que por curto período, pode trazer benefícios no sentido de prevenir doenças devido à maior atuação da linha de frente do sistema imunitário, as células do sistema inato, dentre elas os macrófagos. No modelo de 45 dias, o grupo sem tumor suplementado (grupo CT) apresentou elevação da atividade macrofágica (aumento de fagocitose e produção de NO) em relação ao grupo C, sugerindo também benefício para um indivíduo suplementado por mais tempo com FBG.

A resposta linfocitária foi avaliada mediante estímulo da proliferação de três diferentes populações de linfócitos com Concanavalina A (potente mitógeno para linfócitos T) e LPS (mitógeno para linfócitos B). Foram analisadas as respostas após 48 h de cultivo com mitógenos. Sabe-se que diferentes subpopulações linfocitárias apresentam graus de diferenciação específicos, e respostas diferentes entre elas são esperadas (BLUM; PABST, 2007).

No modelo de 15 dias, linfócitos T e B do sangue de animais de diferentes grupos apresentaram resposta semelhante (Figura 7). Linfócitos de timo e linfonodos mesentéricos do grupo W apresentaram redução da resposta proliferativa em relação ao grupo sem tumor (C). A redução da capacidade proliferativa de linfócitos de animais portadores de tumor de Walker 256 não tratado em relação a animais não portadores de tumor foi observada por Bacurau et al (2007). O restabelecimento da resposta proliferativa dos linfócitos T e B de timo do grupo WT (Figura 8) para valores semelhantes aos dos animais sem tumor chama a atenção, e revela uma capacidade imunoestimulatória da suplementação por 15 dias com FBG. Este padrão de resposta também foi observado para linfócitos T e B obtidos de linfonodos mesentéricos (Figura 9), ou seja, linfócitos do grupo WT proliferaram significativamente mais que os do grupo W. Entretanto, como discutido anteriormente em relação ao aumento da atividade macrofágica em WT, o aumento da capacidade proliferativa linfocitária no grupo WT não foi capaz de combater o crescimento do tumor no modelo de 15 dias.

No modelo de 45 dias a resposta linfocitária do grupo WT em relação ao grupo W foi semelhante no caso dos linfócitos de timo e linfonodos mesentéricos (Figuras 11 e 12), e foi menor tratando-se de linfócitos do sangue (Figura 10). Novamente, assim como foi com a resposta dos macrófagos, o consumo da FBG no modelo de 45 dias parece ter mantido ou diminuído a função linfocitária de animais com tumor (WT) em relação a animais com tumor sem tratamento (W). Isso sugere que no modelo de 45 dias o sistema imune não foi decisivo na redução da massa tumoral observada, mas sim a ação direta da suplementação com FBG sobre as células tumorais. Ou ainda, uma vez que o tumor cresceu menos em WT do que em W no modelo de 45 dias, o sistema imune adaptativo foi menos requisitado em WT.

Ao observarmos os linfócitos dos animais sem tumor (C vs CT), verifica-se que a suplementação por 15 e 45 dias manteve ou reduziu a capacidade proliferativa. Este resultado indica que em um cenário sem tumor, a ingestão de FBG não intensifica a resposta proliferativa linfocitária, ao contrário do que foi observado para macrófagos.

Não há na literatura estudos que mostrem o efeito de compostos da fruta de *C. adamantium* sobre capacidade proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos, apenas efeito estimulatório sobre a migração de linfócitos do sangue para o tecido de animais tratados com extratos de casca e polpa da fruta (CAMPOS et al., 2017; VISCARDI et al., 2017b). Considerando outras frutas, Sasmito et al (2015) verificaram que a fração polissacarídica do suco da fruta noni (*Morinda citrifolia* L.) nas doses de 25 e 50 mg/kg de peso corpóreo foi capaz de elevar o número de linfócitos T CD8+ no sangue de ratos Wistar depois de ingerida por 7 dias via oral, concomitantemente a tratamento intraperitoneal com doxorubicina (quimioterápico que reduz resposta imunitária).

Desta forma, neste trabalho, nos animais portadores de tumor a ingestão de FBG por 15 dias promoveu estímulo de macrófagos e linfócitos, porém não interferiu no crescimento tumoral. Em contrapartida, a ingestão por 45 dias manteve ou reduziu a atividade de macrófagos e linfócitos, mas foi hábil em reduzir significativamente a massa e a proliferação tumoral. Assim, os resultados sugerem que a ingestão da FBG por 15 dias não foi suficiente para promover redução do tumor, diferente do que foi observado quando a ingestão se deu por 45 dias. Ainda, no modelo de 45 dias o efeito parece ter sido diretamente sobre as células tumorais.

Em relação aos animais não portadores de tumor, aqueles suplementados com FBG por 15 e 45 dias apresentaram elevação da atividade de macrófagos sem elevar proliferação linfocitária. Estes dados sugerem que mesmo na ausência de tumor a ingestão de FBG promove estimulação do sistema imune inato.

6 CONCLUSÃO

Em animais portadores de tumor:

A ingestão de FBG por 15 dias promoveu estímulo de macrófagos e linfócitos, porém não interferiu no crescimento tumoral.

A ingestão por 45 dias manteve ou reduziu a atividade de macrófagos e linfócitos, porém foi hábil em reduzir significativamente a massa e a proliferação tumoral.

Os resultados sugerem que a ingestão da FBG por 15 dias não foi suficiente para promover redução do tumor, diferente do que foi observado quando a ingestão se deu por 45 dias. Ainda, no modelo de 45 dias o efeito parece ter sido diretamente sobre as células tumorais.

Em animais não portadores de tumor:

Animais suplementados com FBG por 15 e 45 dias apresentaram elevação da atividade de macrófagos sem elevar proliferação linfocitária.

Estes dados sugerem que mesmo na ausência de tumor a ingestão de FBG promove estimulação do sistema imune inato.

Tomados em conjunto os resultados indicam que a ingestão de FBG tem atividade imunomodulatória e antitumoral. Futuras investigações envolvendo ingestão da farinha poderão revelar outros benefícios bem como os mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos encontrados neste trabalho. Cabe ressaltar que trata-se de um produto de fácil acesso, natural e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

ALVES, C.C.F et. al. Antiproliferative activity of essential oils from three plants of the Brazilian Cerrado: *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), *Protium ovatum* (Burseraceae) and *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 6984, p. 1-5, 2019.

AL-ZHOUGHBI, W. et. al. Tumor Macroenvironment and Metabolism Wael. **Seminars in Oncology**, v. 41, n. 2, p. 281-295, 2014.

AMER, A.; SWANSON, M.S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 55-61, 2002.

ARANTES, A. A.; MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Instituto de Ciências Biológicas – UFMG**, v. 3, n. 2, p. 111-127, 2002.

BACURAU, A.V.N. et. al. Effect of a High-Intensity Exercise Training on the Metabolism and Function of Macrophages and Lymphocytes of Walker 256 Tumor-Bearing Rats. **Society for Experimental Biology and Medicine**. 2007.

BELLO, S.R.B. **Estudo da suplementação com óleo de peixe associado ao de fígado de tubarão sobre o crescimento tumoral e resposta de macrófagos peritoneais em ratos portadores de tumor de walker 256**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

BELLO, S.R.B. et. al. Walker-256 tumor growth is inhibited by the independent or associative chronic ingestion of shark liver and fish oil: a response linked by the increment of peritoneal macrophages nitrite production in Wistar rats. **Nutrition Research**, v. 30, n. 11, p. 770-776, 2010.

BERGMAN, M. et al. Effect of citrus pectin on malignant cell proliferation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 44–47, 2010.

BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160–174, 2012.

BLUM, K. S.; PABST, R. Lymphocyte numbers and subsets in the human blood Do they mirror the situation in all organs ?. **Immunology Letters**, v. 108, p. 45–51, 2007.

BONATTO, S.J.R. **Avaliação da resposta imunitária em macrófagos de ratos F1, portadores de tumor de Walker 256, suplementados cronicamente com óleo de peixe**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BOROUGHES, L. K.; DEBERARDINIS, R. J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. **Nat Cell Biol**, v. 17, n. 4, p. 351–359, 2016.

CAMPOS, J. F. et al. Leaf and root extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) promote apoptotic death of leukemic cells via activation of intracellular calcium and caspase-3. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 466, 2017.

CANTOR, J. R.; SABATINI, D. M. Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 10, p. 881 - 898, 2012.

CAO, W. et al. Phytomedicine A novel polysaccharide , isolated from *Angelica sinensis* (Oliv .) Diels induces the apoptosis of cervical cancer HeLa cells through an intrinsic apoptotic pathway. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8–9, p. 598–605, 2010.

CARDOSO, C.M.L. et al. Therapeutic Potential of Brazilian Cerrado *Campomanesia* Species on Metabolic Dysfunctions. **Molecules**, v. 23, n.2336, p. 1–17, 2018.

CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage Polarization in Health and Disease. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 2391–2402, 2011.

CAZARIN, C. B. B. et al. *Passiflora edulis* peel intake and ulcerative colitis: Approaches for prevention and treatment. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 5, p. 542–551, 2014.

CHABNER, B. A. et al. Manual de Oncologia de Harrison. 2o ed. Artmed, 2015.

CHUNG, W.S.F. Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 93, n. 11, p. 1 - 9, 2017.

CORTHAY, A. Does the immune system naturally protect against cancer? **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 197, p. 1–8, 2014.

COTA, A. M.; MIDWINTER, M. J. The immune system. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 16, n. 7, p. 353–355, 2015.

COUTINHO, I. D. et al. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Ecl. Quím**, v. 33, n. 4, p. 53–60, 2008.

CRUVINEL, W. DE M. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434–61, 2010.

DA SILVA, J. K. et al. Effects of passion fruit (*Passiflora edulis*) byproduct intake in antioxidant status of Wistar rats tissues. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P2, p. 1213–1219, 2014.

SOUZA, J. C. et al. Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 23 - 31, 2017.

DELPHI, L.; SEPEHRI, H.; KHORRAMIZADEH, M. R. Pectic-Oligosaccharides from Apples Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest in MDA-MB-231 Cells, a Model of Human Breast Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 5265 - 5271, 2015.

DELPHI, L.; SEPEHRI, H.; PHYSIOLOGY, Apple pectin: A natural source for cancer suppression in 4T1 breast cancer cells in vitro and express p53 in mouse bearing 4T1 cancer tumors, in vivo. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 84, p. 637–644, 2016.

DELZENNE, N. M. Oligosaccharides: state of the art. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 01, p. 177–182, 2003.

DOMBLIDES, C.; LARTIGUE, L.; FAUSTIN, B. Metabolic Stress in the Immune Function of T Cells, Macrophages and Dendritic Cells. **Cells**, v. 7, n. 7, p. 68, 2018.

ELKON, K. B.; RHIANNON, J. J. Innate immunity. **Scleroderma: From Pathogenesis to Comprehensive Management**, v. 125, n. 2, p. 191–197, 2012.

FEINBERG, A. P.; KOLDOBSKIY, M. A.; GÖNDÖR, A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 15, p. 284 - 299, 2016.

FERNANDES, L. C. et al. Improvement of cancer cachexia and decrease of Walker 256 tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Ther. Control**, v. 1, p. 259–268, 1991.

FERREIRA, L. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 100–108, 2013.

FINN, O. J. Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 8, p. 8 - 11, 2012.

GENG, P. et. al. Antifatigue Functions and Mechanisms of Edible and Medicinal Mushrooms. **BioMed Research International**, p. 1-16, 2017.

GLINSKY, V. V; RAZ, A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet , multiple targets. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1788–1791, 2009.

HAGERLING, C.; CASBON, A. J.; WERB, Z. Balancing the innate immune system in tumor development. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 4, p. 214–220, 2015.

HATO, T.; DAGHER, P. How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 7, n. 10, p. 1459–1469, 2015.

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, v. 8, n. 336, p. 1268–1273, 2012.

INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; organização Mario Jorge Sobreira da Silva.** – 3. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro, 2017a.

INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; organização Mario Jorge Sobreira da Silva.** – 5. ed. rev. atual. ampl. – Rio de Janeiro, 2019a.

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro. 2017b.

INCA. O que é o câncer? Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 17 set. 2019b.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Inmunidad Innata. **Nature immunology**, v. 16, n. 4, p. 343–353, 2015.

IZQUIERDO-VEGA, I. et al. Evidence of Some Natural Products with Antigenotoxic Effects. Part 1: Fruits and Polysaccharides. **Nutrients**, v. 9, n. 102, p. 1–27, 2017.

JAIN I, KUMAR V, S. T. Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. **Indian J Exp Biol.**, v. 53, p. 131–42, 2015.

JANSSEN, L. M. E. et al. The immune system in cancer metastasis: Friend or foe?. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2017.

JOHANSEN, R. Norske kreftpasienter og helsekostmarkedet – hva brukes og hvorfor ?. **Tidsskr Nor Lægeforen**, v. 5, n. 6, p. 773–775, 2006.

KLOSTERHOFF, L. et al. Anti-fatigue activity of an arabinan-rich pectin from acerola(Malpighia emarginata). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1147–1153, 2018.

KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L.; DANG, C. V. current concepts of cancer metabolism. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 5, p. 325–337, 2011.

KRON, K. J.; BAILEY, S. D.; LUPIEN, M. Enhancer alterations in cancer : a source for a cell identity crisis. **Genome Medicine**, v. 6, n. 77, p. 1–12, 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robins Patologia Básica.** 9º ed. Rio de Janeiro: 2017.

LA FATA, G.; WEBER, P.; MOHAJERI, M. H. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 1, p. 11–21, 2018.

LAGO, J. H. G. et al. Structure-Activity association of flavonoids in lung diseases. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3570–3595, 2014.

LECLERE, L.; CUTSEM, P. VAN; MICHIELS, C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. 128, p. 1–8, 2013.

LESCANO, C. H. et al. Campomanesia adamantium peel extract in antidiarrheal activity: The ability of inhibition of heat-stable enterotoxin by polyphenols. **Plos ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–15, 2016.

LESCANO, C. H. et al. Effect of polyphenols from Campomanesia adamantium on platelet aggregation and inhibition of cyclooxygenases: Molecular docking and in vitro analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 167, p. 1–13, 2018.

LI, Y. et al. 2015 Advances in Colorectal Cancer Role of phytochemicals in colorectal cancer prevention. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 31, p. 9262–9272, 2015.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757–772, 2018.

LIMA E SILVA, M. et al. Antiproliferative Activity of Extracts of Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg and Isolated Compound Dimethylchalcone Against B16-F10 Murine Melanoma. **Journal Of Medicinal Food**, p. 1–11, 2018.

LIU, Z. et al. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 477, p. 1–14, 2018.

MARKOWIAK, P.; SLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017.

MARSHALL, J. S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 14, n. 2, p. 1–10, 2018.

MEDEIROS ALVES, A. et al. Caracterização Física E Química, Fenólicos Totais E Atividade Antioxidante Da Polpa Physical and Chemical Characterization, Total Phenolics and Antioxidant Activity of the Gabiroba Pulp and Residue. **Rev. Bras. Frutic**, v. 35, n. 3, p. 837–844, 2013.

MESSERSCHMIDT, J. L.; PRENDERGAST, G. C.; MESSERSCHMIDT, G. L. How Cancers Escape Immune Destruction and Mechanisms of Action for the New Significantly Active Immune Therapies: Helping Nonimmunologists Decipher Recent Advances. **The Oncologist**, v. 21, n. 2, p. 233–243, 2016.

MEYENBERG, M. et al. International Journal of Biological Macromolecules Galactomannan from Schizolobium amazonicum seed and its sulfated derivatives impair metabolism in HepG2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 464–473, 2017b.

MEYENBERG, M. et al. Toxicity of native and oxovanadium (IV / V) galactomannan complexes on HepG2 cells is related to impairment of mitochondrial functions. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 665–675, 2017a.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. OPAS Folha Informativa - Câncer. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>. Acesso em: 17 set. 2019.

PASCOAL, A. C. R. F. et al. Antiproliferative Activity and Induction of Apoptosis in PC-3 Cells by the Chalcone Cardamonin from Campomanesia adamantium (Myrtaceae) in a Bioactivity-Guided Study. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1843–1855, 2014.

PATERNIT, I. et. al. The Anti-Inflammatory and Antioxidant Potential of Pistachios (Pistacia vera L.) In Vitro and In Vivo. **Nutrients**, v. 9, n. 915, p.1-74, 2017.

PEREIRA, P. et al. Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of Campomanesia adamantium O . Berg Root. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

PIPE, R.K.; COLES, J.A.; FARLEY, S. Assays for measuring immune response in the mussel Mytilus edulis. **Tech. Fish Immunol**, v. 4, p. 93–100, 1995.

PIZATO, N. M. P. **Efeito da dieta com diferentes proporções de ácidos graxos n-6:n-3 sobre o crescimento tumoral, caquexia e sistema imunitário em ratos portadores de tumor de Walker 256**. Dissertação (mestrado em fisiologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

RHEE, I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 11, p. 1588-1596. 2016.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **As Principais Fitofisionomias do Bioma Cerrado**. Embrapa, 1998

ROHM, M. et al. Energy metabolism in cachexia. **EMBO reports**, p. 1–13, 2019.

ROSEN, H.; GORDON, S. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. **J Exp Med**, v. 166, n. 6, p. 1685-1701, 1987.

RUTERING, J. et al. Improved Method for Isolation of Neonatal Rat Cardiomyocytes with Increased Yield of C-Kit⁺ Cardiac Progenitor Cells. **Stem Cell Res Ther** 5, v. 5, n. 6, p. 1–8, 2015.

SASMITO, E. et al. Polysaccharide-Rich Fraction of Noni Fruit (*Morinda citrifolia* L.) as Doxorubicin Co-Chemotherapy: Evaluation of Catalase, Macrophages, and TCD8⁺ Lymphocytes. **Sci Pharm.**, v. 3, n. 83, p. 379-388, 2015.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacolog**, v. 6, p. 317–333, 2006.

SCHNEIDER, V.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. β -L-Araf-containing arabinan and glucuronoxylan from guavira fruit pomace. **Carbohydrate Research**, v. 481, p. 16–22, 2019.

SHASHANK, K.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids. **Hindawi The Scientific World Journal**, v. 2013, n. 12, p. 533–548, 2013.

SHRESTHA, G.; CLAIR, L. L. S.; NEILL, K. L. O. The Immunostimulating Role of Lichen Polysaccharides: A Review. **Phytother res.**, v. 29, n.3, p. 317-322, 2014.

SILVA, M.C.B.L.E. et al. Antiproliferative Activity of Extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and Isolated Compound Dimethylchalcone Against B16-F10 Murine Melanoma. **Journal Of Medicinal Food**, v. 00, n. 0, p. 1–11, 2018.

STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. **NIH Public Access**. v. 205, p. 60–71, 2005.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **PNAS**, v. 82, n. 22, p. 7738-7742, 1985.

TAMIELLO, C. et al. Structural features of polysaccharides from edible jambo (*Syzygium jambos*) fruits and antitumor activity of extracted pectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, n. 15, p. 1414–1421, 2018.

TOGNI, V. et al. Cancer Cachexia and Tumor Growth Reduction in Walker 256 Tumor-Bearing Rats Supplemented With N-3 Polyunsaturated Fatty Acids for One Generation. **Nutrition and Cancer**, v. 46, n. 1, p. 52-58, 2003.

TURATI, F. et al. Fruit and vegetables and cancer risk: A review of southern European studies. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. S2, p. S102–S110, 2015.

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages : Development and Tissue Specialization. **Rev. Immunol.**, v. 33, p. 643–675, 2015.

VISCARDI, D. Z. et al. Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 2, p. 220–227, 2017b.

VISCARDI, D. Z. et al. Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. **Plos ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–15, 2017a.

VOS, A. P. et al. Immune-Modulatory Effects and Potential Working Mechanisms of Orally Applied Nondigestible Carbohydrates. **Critical Reviews in Immunology**, v. 27, n. 2, p. 97–140, 2007.

WANG, D. et al. Systematic fractionation and immunoenhancement of water-soluble polysaccharides isolated from fruit of *Morus alba* L. **Biological Macromolecules**, p. 1-16, 2018.

WANG, G. et al. Exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* induces macrophage activation. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 112–120, 2016.

WANG, H. et al. Anticancer and immunostimulating activities of a novel homogalacturonan from *Hippophae rhamnoides* L. berry. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 288–296, 2015.

WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **NIH Public Access**. v. 21, n. 3, p. 297–308, 2013.

WATZL, B.; GIRRBACH, S.; ROLLER, M. Inulin , oligofructose and immunomodulation. **British Journal of Nutrition**, v. 1, n. 93, p. 549–S55, 2015.

WEI, Z.; CHEN, G.; CHEN, K. *Rhizopus nigricans* polysaccharide activated macrophages and suppressed tumor growth in CT26 tumor-bearing mice. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 302–312, 2018.

WONG, C.; HARRIS, P. J.; FERGUSON, L. R. Potential benefits of dietary fibre intervention in inflammatory bowel disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, 2016.

WU, X. et al. Isolation, purification and in vitro anti-tumor activity of polysaccharide from *Ginkgo biloba* sarcotesta. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 1073–1076, 2011.

XIE, X.; ZOU, G.; LI, C. Antitumor and immunomodulatory activities of a water-soluble polysaccharide from *Chaenomeles speciosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 323–329, 2015.

YATIM, K. M.; LAKKIS, F. G. A brief journey through the immune system. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 7, p. 1274–1281, 2015.

ZHANG, S. et al. Isolation and structural characterization of a pectin from *Lycium ruthenicum* Murr and its anti-pancreatic ductal adenocarcinoma cell activity. **Carbohydrate Polymers**, p. 115- 124, 2019.

ZHANG, Y. et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of an acidic polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 401–408, 2016.

ZITVOGEL, L. et al. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 74–88, 2013.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395–1410, 2012.